
Verfeinerung präklinischer Studien durch Einzelmolekülmikroskopie am Beispiel der FAK

Refinement of preclinical studies by single molecule microscopy using the example of the FAK

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von Alexander Krömmelbein (M.Sc.) aus Darmstadt

Tag der Einreichung: 29.10.2019, Tag der Prüfung: 06.12.2019

1. Gutachten: PD Dr. Tobias Meckel

2. Gutachten: Prof. Dr. Gerhard Thiel



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich 10 - Biologie Technische
Universität Darmstadt

Darmstadt - 2019

Verfeinerung präklinischer Studien durch Einzelmolekülmikroskopie am Beispiel der FAK
Refinement of preclinical studies by single molecule microscopy using the example of the FAK

Genehmigte Dissertation von Alexander Krömmelbein (M.Sc.) aus Darmstadt

1. Gutachten: PD Dr. Tobias Meckel
2. Gutachten: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 29.10.2019

Tag der Prüfung: 06.12.2019

Bitte zitieren Sie dieses Dokument als:

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-91772

URL: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/9177>

Dieses Dokument wird bereitgestellt von tuprints,

E-Publishing-Service der TU Darmstadt

<http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de>

tuprints@ulb.tu-darmstadt.de



Die Veröffentlichung steht unter folgender Creative Commons Lizenz:

Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung – Keine Bearbeitung 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Zelladhäsion	3
1.2 Fokale Adhäsionen	4
1.3 Tyrosinkinasen und FAK	6
1.4 In der Arbeit verwendete Zellkulturen	8
1.4.1 MEF	8
1.4.2 SW620	9
1.5 Präklinische Studien in der Pharmaforschung	10
1.6 FAK-Inhibitoren	12
1.6.1 Y11	12
1.6.2 Y15	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Ergebnisse	16
2.1 Einfluss der Inhibitoren Y15 und Y11 auf das Überleben von MEF- und SW620-Zellen	17
2.1.1 Einfluss von Y15 auf lebende Zellen	18
2.1.2 Einfluss von Y11 auf lebende Zellen	22
2.2 Konfokalmikroskopie und Auswahl der Antikörper	26
2.3 Einzelmolekülmikroskopie und die Validierung der Methode	31
2.3.1 Validierung der Clusteridentifikation und -analyse	31
2.4 Einfluss der Inhibitoren auf pFAK-Cluster auf Einzelmolekülebene	36
2.4.1 Einfluss von Y15 auf pFAK-Cluster in MEF-Zellen	36
2.4.2 Einfluss von Y11 auf MEF-Zellen	39
2.4.3 Einfluss von Y15 auf SW620-Zellen	43
2.4.4 Einfluss von Y11 SW620-Zellen	46
2.4.5 Zusammengefasste Ergebnisse der Einzelmolekülmikroskopie	49
3 Diskussion	51
3.1 Optimierung durch erhöhte Auflösung und Sensibilität	52
3.2 Clusteranalyse	56
3.3 FAK-Inhibition - eine gute Idee?	58

3.4	Ausblick	62
3.4.1	Ein variables System - mit viel Potenzial	62
3.4.2	Was passiert in 5 bis 10 Jahren?	63
4	Methoden	65
4.1	Zellkultur	65
4.1.1	Embryonale Mausfibroblasten (MEF)	65
4.1.2	Humane Darmkrebszellen (SW620)	65
4.1.3	Zellpassage	65
4.1.4	Probenvorbereitung	65
4.2	Färbungen und Markierungen	66
4.2.1	Antikörpermarkierungen	66
4.2.2	Calcein- & Hoechst-Färbung	66
4.3	Einzelmolekülmikroskopie	67
4.3.1	TIRF & PALM	67
4.3.2	FIJI & ThunderSTORM	69
4.4	Clusteranalyse	70
4.5	Statistische Auswertung	70
4.6	Materialien	71
	Literatur	72
5	Anhang	81
5.1	Simulationsskript	81
5.2	Clusteranalyse	83
5.2.1	Funktion: dbscan	91
5.2.2	Funktion: hdbscan	93
5.2.3	Funktion: threshold	95
	Erklärung der eigenen Arbeit	97
	Danksagung	98
	Abkürzungsverzeichnis	99
	Abbildungsverzeichnis	100
	Ehrenwörtliche Erklärung	102

Zusammenfassung

Das Anheften von Zellen an ihre Außenwelt und anderen Zellen ist die Basis vielzelliger Organismen. Diese Adhäsion wird durch Proteine, welche in der Zellmembran liegen, ermöglicht. Die Fähigkeit zur Adhäsion wird daher in vielen Experimenten als Test der Viabilität herangezogen. Ist eine normalerweise adhärente Zelle nicht mehr in der Lage, sich an ihre Umgebung anzuheften, leitet sie üblicherweise den Zelltod ein. Die Mechanismen der Adhäsion, und die damit verbundene Migration, sind also eine essenzielle Funktion von adhärenenten Zellen.

In der Signalweiterleitung der Zelle bei einer Anheftung ist eines der Hauptaktoren das Protein Fokale Adhäsionskinase (FAK). Sie ist für den Auf- sowie Abbau der fokalen Adhäsionen zuständig und sorgt somit für die Anheftung der Zelle und die dadurch resultierende Verbindung zwischen extra- und intrazellulären Strukturen.

Aufgrund dieser essenziellen Aufgabe und der Tatsache, dass die FAK eine erhöhte Expression und Aktivität in diversen Krebszellen aufzeigt, wird sie oft in der medizinischen Forschung als mögliches Zielprotein für Medikamente betrachtet.

Es gibt bereits Forschungen die zeigen, dass sich die Viabilität von Krebszellen bei der Inhibition der FAK verringert. Diese Beobachtungen beruhen hauptsächlich auf Lebendzellfärbungen sowie Adhäsionstests.

In dieser Arbeit wurden zwei FAK-Inhibitoren und deren Wirkung auf die phosphorylierte Form der FAK mittels Einzelmolekülmikroskopie auf molekularer Ebene untersucht. Die einzelnen detektierten Proteine wurden anschließend durch eine automatisierte Auswertung analysiert und deren Eigenschaften bezüglich Clusterbildung innerhalb fokaler Adhäsionen charakterisiert.

Abschließend wurden diese Einzelmoleküldaten mit eigenen Lebendzellfärbungen und etablierter Literatur in einen gemeinsamen Kontext gebracht.

Abstract

The attachment of cells to their environment and to other cells is the basis of multicellular organisms. This adhesion is made possible by proteins located in the cell membrane. The ability to adhere is therefore used in many experiments as a test of viability. If a normally adherent cell is no longer able to adhere to its environment, it usually initiates apoptosis.

The mechanisms of adhesion and the associated migration are therefore an essential function of adherent cells.

In the signalling pathways within cells during attachment, one of the main actors is the protein focal adhesion kinase (FAK). It is responsible for the set-up and degradation of focal adhesions and thus ensures the attachment of the cell and the resulting connection between extracellular and intracellular structures.

Due to this essential task and the fact that FAK shows increased expression and activity in various cancer cells, it is often regarded as a potential target protein for drugs in medical research.

Studies have already shown that the viability of cancer cells is reduced by the inhibition of FAK. These observations are mainly based on live-cell stainings and adhesion tests. In this thesis, two FAK inhibitors and their effect on the phosphorylated form of the FAK using single-molecule microscopy were analyzed at the molecular level. The individual detected proteins were then further processed by automated evaluation and resulted in characterizations regarding their properties with respect to cluster formation within focal adhesions.

Finally, these single molecule data were brought into a common context with their own live cell staining and established publications.

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Die Basis vielzelliger Organismen ist die Anheftung, oder Adhäsion, einzelner Zellen an entweder extrazelluläre Strukturen (ECM) oder an andere Zellen.

Die Adhäsion ist nur möglich, weil die Plasmamembran, welche jede Zelle umgibt, Proteine beinhaltet, die das Äußere der Zelle mit dem Inneren verbinden.

Im Allgemeinen werden tierische Zellen in eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen unterteilt. In dieser Arbeit wird zunächst auf die hauptsächliche Unterteilung von adhärenenten und nicht adhärenenten Zellen eingegangen, da der Hauptfokus auf adhärenenten Zellen und im Detail auf den Proteinen, die für Adhäsion und Migration zuständig sind, liegt.

In Organismen unterscheiden sich diese beiden Zelltypen sowohl in der Morphologie als auch in ihrer Funktion erheblich. Die wohl bekanntesten nicht adhärenenten Zellen in tierischen Organismen sind Erythrozyten und Leukozyten. Da sie sich aufgrund ihrer Aufgaben im Körper frei im Blut bewegen, haben sie wie die meisten nicht adhärenenten Zellen, eine rundliche Morphologie und sind vereinzelt.

Dagegen besitzen adhärenente Zellen eine unterschiedliche Morphologie, welche auch abhängig von ihrer Umgebung ist. Sie bilden im Verbund solide Gewebe und Organe aus und organisieren sich gegenseitig im direkten Kontakt. Die Merkmale eines Gewebes werden durch die Ähnlichkeit der darin befindlichen Zellen bezüglich Funktion und Zelltyp bestimmt. Die typischen Unterteilungen der Gewebe innerhalb eines Organismus sind Epithelgewebe, Bindegewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe. Um die hierfür nötige Adhäsion an der ECM und anderen Zellen zu begünstigen, bilden diese Zellen Pseudopodien, meist Lamellipodien, aus.

Damit die direkte Außenwelt sensiert und mit ihr interagiert werden kann, besitzen Zellen daher Proteine, die in der Plasmamembran verankert oder zumindest an diese gebunden sind. In dieser Arbeit wird im Folgenden nur auf Proteine eingegangen, welche an der fokalen Adhäsion beteiligt sind. Diese übernehmen diverse Aufgaben, die von Proliferation [1, 2, 3, 4] und Adhäsion [5, 6, 7, 8, 9] bis zur Migration [10, 11, 12, 13] reichen. Diese Zelladhäsionsmoleküle sind Transmembranproteine und damit Teil einer sehr großen Proteinfamilie. Innerhalb dieser Gruppe gibt es Proteine für die Adhäsion an die ECM [14, 15, 16], und auch solche, die mit benachbarten Zellen interagieren [17, 18, 19]. Obwohl die Aufgaben sehr unterschiedlich sind, teilen sich die Adhäsionsmoleküle die Fähigkeit, den Ausbau und Verbund von Gewebe organisieren zu können [20, 21, 15, 22, 23]. Sie steuern die Adhäsion und Migration durch den ständigen Auf- und Abbau von Zelladhäsionen.

Eine der wichtigsten und weit verbreitetsten Adhäsionsproteine ist die Familie der Integrine.

1.2 Fokale Adhäsionen

Integrine sind Transmembranproteine und bilden Heterodimere. Diese bestehen immer aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, einer α - und einer β -Untereinheit [24, 25, 26]. Insgesamt gibt es in Säugerzellen 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten, wobei bislang insgesamt 24 Heterodimere identifiziert wurden [25, 27, 19, 15, 28]. Integrine bilden die äußerste Verankerung der Zellen an die ECM. Beim Sensieren und Adhärenz an die ECM bilden sie Cluster und rekrutieren weitere, im Zellinneren befindliche Membran- und Strukturproteine, um die Verbindung mechanisch zu verstärken und diverse Signalwege einzuleiten [14, 29, 30]. Mit am häufigsten ist die Sensierung und Anheftung an Fibronektin durch das Heterodimer $\alpha 5 \beta 1$ [31]. Dieses initiale Sensieren der Integrine und die darauffolgende Antwort geschehen nahezu zeitgleich [32].

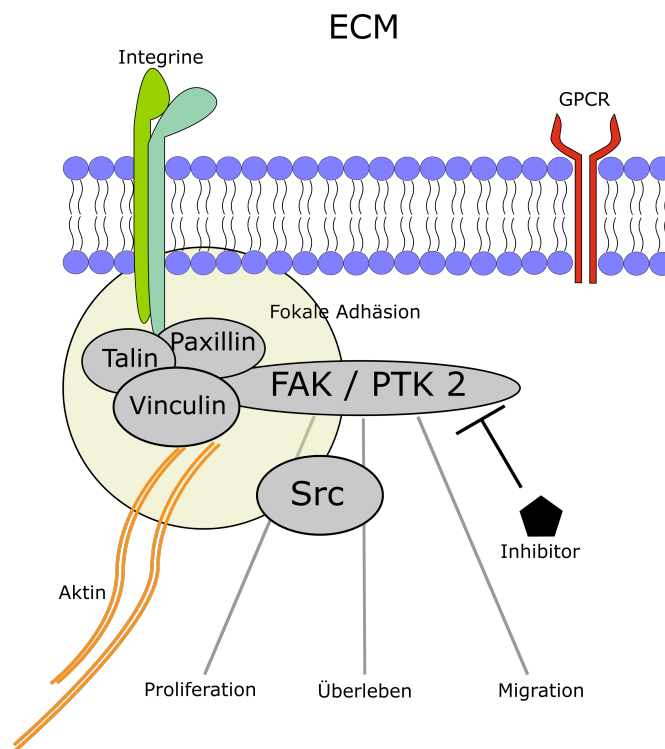


Abbildung 1: Die beiden Untereinheiten (grün) der Integrine sensieren die ECM (in diesem Bild oberhalb der Membran) und rekrutieren auf der Innenseite der Zelle Strukturproteine wie Talin, Paxillin, Vinculin, Src und FAK. Durch die gegenseitige Aktivierung von Src und FAK eröffnen sich unterschiedlichste Signalwege und -kaskaden, die zur Änderung der Proliferation und Migration der Zelle führen. Alle Proteine zusammen bilden eine fokale Adhäsion (FA) (gelber Kreis).

Es kommt zur Bildung einer fokalen Adhäsion (Abb. 1). Auf der Innenseite der Membran werden Strukturproteine, wie Paxillin, Talin und Vinculin von den clusterbildenden Integrinen rekrutiert. Anders als Enzyme, besitzen die meisten Strukturproteine keine katalytische Eigenschaft, sondern sind durch Bindungen ihrer Partner direkt für den Aufbau intrazellulärer Strukturen zuständig. Allerdings gibt es auch eine Vielzahl von Proteinen, die sowohl eine enzymatische als auch strukturelle Funktion besitzen. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Src und FAK, die von

den oben genannten Proteinen Talin, Paxillin und Vinculin rekrutiert werden. Durch eine gegenseitige Aktivierungskaskade von Src und FAK wird eine maximale Aktivität der FAK ermöglicht [33]. Am zytosolischen Ende der fokalen Adhäsion können letztlich Aktinfilamente binden, um das Zytoskelett der Zelle auszubauen und an die neu entstandene Adhäsion knüpfen zu können. Durch den Auf- und Abbau solcher Proteinstrukturen reguliert die Zelle Proliferation und Migration. Fokale Adhäsionen regulieren ebenfalls das Zellüberleben, da das spontane Ablösen von eigentlich adhärenen Zellen zur Apoptose führt. Der generelle Auf- und Abbau solcher Strukturen ist zeitlich auf unter eine Stunde bestimmt worden [16].

1.3 Tyrosinkinasen und FAK

Die FAK, oder auch *protein tyrosine kinase 2* (ptk2), wurde erstmals 1990 von Kanner et al. identifiziert [34]. Es handelt sich um eine 125 kDa große Tyrosinkinase, die eine Vielzahl von Aufgaben in der Zelle übernimmt. Dazu zählt die Regulierung von Migration und Adhäsion sowie das Zellüberleben an sich, denn FAK-*knockout* (FAK^{-/-}) Mausembryonen sind nicht lebensfähig [35]. FAK Homologe wurden 1993 in Menschen [36], 1992 in Mäusen [37] und Hühnern [38] und 1995 in Fröschen [39] identifiziert und beschrieben [40]. Ebenfalls im Jahr 1995 wurden *knockout* Mäuse analysiert, die eine stark beeinträchtigte Entwicklung erleben [8]. Damit ist die FAK ein hoch konserviertes und essenzielles Protein.

Als Tyrosinkinase ist sie Teil der Familie der Proteinkinasen. Diese Kinasen sind Enzyme, die Phosphatgruppen von ATP zu anderen Proteinen transferieren können. Je nach Zielprotein hat ein solcher Transfer eine Aktivierung oder Deaktivierung des Proteins zur Folge. Als Unterfamilie der Proteinkinasen transferieren die Tyrosinkinasen die Phosphatgruppe spezifisch zur Seitenkette eines Tyrosins im Zielprotein. Bereits 1988 wurden über 100 unterschiedliche Proteinkinasen identifiziert und charakterisiert [41].

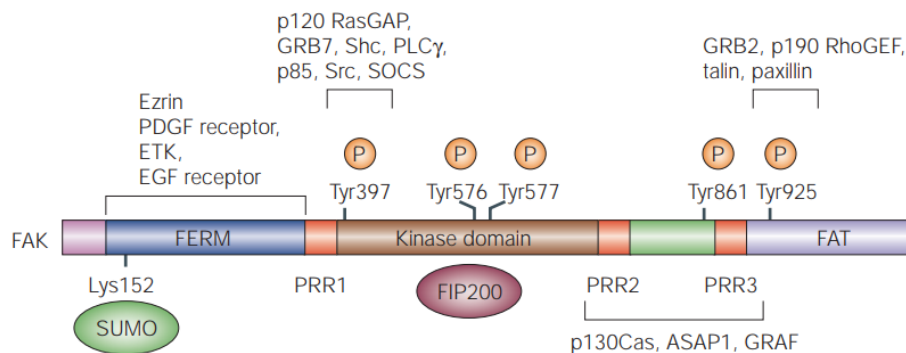


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines FAK-Moleküls. Die drei Domänen, FERM, Kinase und FAT sind farblich markiert und werden durch prolinreiche Regionen (PRR) voneinander getrennt. Zusätzlich ist noch in grün der längere Linker zwischen Kinase und FAT-Domäne dargestellt. Die bei der Aktivierungskaskade entstehenden Phosphorylierungen (P) sind an den jeweiligen Aminosäuren angezeigt. Mögliche Bindepartner wurden anhand ihrer Binderegion innerhalb der FAK zusammengefasst. Durch die Src induzierte Autophosphorylierung am Tyrosin 397 wird die gesamte Aktivierungskaskade in Gang gesetzt. Daher gilt dieser initiale Schritt als die erste und hauptsächliche Aktivierung des Proteins. Quelle der Abbildung: Mitra et al. 2005 [42]

Die fokale Adhäsionskinase ist ein Dreh- und Angelpunkt für viele Signalwege und -kaskaden, und ist ebenfalls als Strukturprotein äußerst wichtig [40, 43]. In dieser Arbeit liegt der wesentliche Fokus auf dem strukturellen Aufgabenbereich der FAK, jedoch übernimmt die FAK auch eine Vielzahl von unterschiedlichen Aufgaben im Organismus. Dazu gehören etliche durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) induzierte Signalkaskaden [44, 35] und sogar die Steuerung unterschiedlicher Expressionen im Nukleus [45], wo sie ebenfalls für die Degradati-

on von p53 zuständig ist [46]. Diese letzte Beobachtung ist von großer medizinischer Relevanz und wird nochmals in den Kapiteln 1.5 und 3.3 aufgegriffen.

Grundsätzlich lässt sich der intramolekulare Aufbau des Proteins in drei Segmente aufteilen, die N-terminale FERM-Domäne, die zentral gelegene Kinase-Domäne und die C-terminale FAT-Domäne, die jeweils durch prolinreiche Regionen (PRR) getrennt werden (Abb. 2) [42]. Zudem gibt es zwischen der Kinase und der FAT-Domäne noch einen längeren Linker. Das in der Abbildung gezeigte *FAK-interacting protein* (FIP200) reguliert durch das Binden an die Kinase-Domäne dessen Aktivität [42, 11]. Die dargestellte Interaktion von *small ubiquitin-related modifier* (SUMO) und der FERM-Domäne der FAK findet am Lysin 152 statt und resultiert in einer posttranslationalen Veränderung des Proteins [7, 42]. Dieser, als *sumoylation* beschriebene Prozess, ist hauptsächlich für den Import von Proteinen in den Zellkern relevant. Es wurde aber auch gezeigt, dass er im Falle der FAK ebenfalls für Veränderungen der katalytischen Aktivität sorgt [7, 42]. Beide Prozesse werden in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Wie der Name 'Fokale Adhäsionskinase' impliziert, fungiert die FAK, neben den Aufgaben im Zellkern, hauptsächlich an Adhäsionspunkten der Zellmembran und reguliert hier sowohl den Auf- als auch den Abbau von fokalen Adhäsionen [13]. Sie ist also für das Aufrechterhalten der fokalen Adhäsionen zuständig. Diese allgegenwärtig exprimierte Tyrosinkinase wird ebenfalls von diversen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren rekrutiert [29]. Hier wirkt die FAK, obwohl sie ebenfalls mit Src eine gegenseitige Aktivierung vornimmt, mehr als Kinase, als ein Strukturprotein bei den fokalen Adhäsionen. Für den zweiten Fall, auf dem auch der Fokus dieser Arbeit liegt, wird die gegenseitige Aktivierung von Src und FAK durch die Bindung von FAK an Talin, Paxillin und Vinculin durch die Rekrutierung über Integrine initiiert. Dadurch wird die Autophosphorylierung der FAK am Tyrosin 397 begünstigt (pFAK), was wiederum eine SH2-Bindedomäne für Src eröffnet. Durch die Bindung von Src, wird die FAK ebenfalls an den Tyrosinen 576, 577 und 925 phosphoryliert. Gleichzeitig werden durch die Aktivierung der Src, hauptsächlich durch die Phosphorylierung des Tyrosins 530, weitere Signalmoleküle wie Cortactin, p120 Catenin und RhoGAP aktiviert.

1.4 In der Arbeit verwendete Zellkulturen

1.4.1 MEF

Embryonale Mausfibroblasten (MEF) sind Bindegewebszellen und als solche sowohl als allein-stehende Zellkultur als auch als *feeder layer* weit verbreitet [47]. Als *feeder cells* oder Fütterzellen werden sekundäre Zellkulturen bezeichnet, die durch ihre Eigenschaften das Wachstum und die Kultivierung der eigentlichen Zellkultur (meist primäre Zellkulturen) begünstigen. Die Technik des *feedes layer* wurde erstmals 1955 von Puck und Marcus beschrieben [20]. Im Beispiel von MEF-Zellen, oder Bindegewebszellen im Allgemeinen, liegt der Fokus auf der Sezernierung, beispielsweise von Wachstumsfaktoren und Kollagen [47, 12]. MEF-Zellen wurden bereits 1963 als Zellkultur etabliert [48] und sind spontan immortalisiert. Durch die guten Eigenschaften als *feeder layer* sind sie in der Stammzellforschung weit verbreitet, allerdings werden sie auch oft als alleinstehende Zellkultur in diversen Arbeiten verwendet.

Die morphologischen Charakteristiken sind in Abbildung 3 zu sehen. Sie bilden unter anderem deutlich erkennbare Adhäsionspunkte bzw. fokale Adhäsionen aus. Sie sind, solange sie adhärent in 2D-Kulturen wachsen, meist sehr gestreckte und bewegliche Zellen, die in einem Monolayer wachsen. Das heißt, sie proliferieren bzw. migrieren, anders als beispielsweise kanzeröse Zelllinien, erst bei nahezu 100% Konfluenz übereinander.

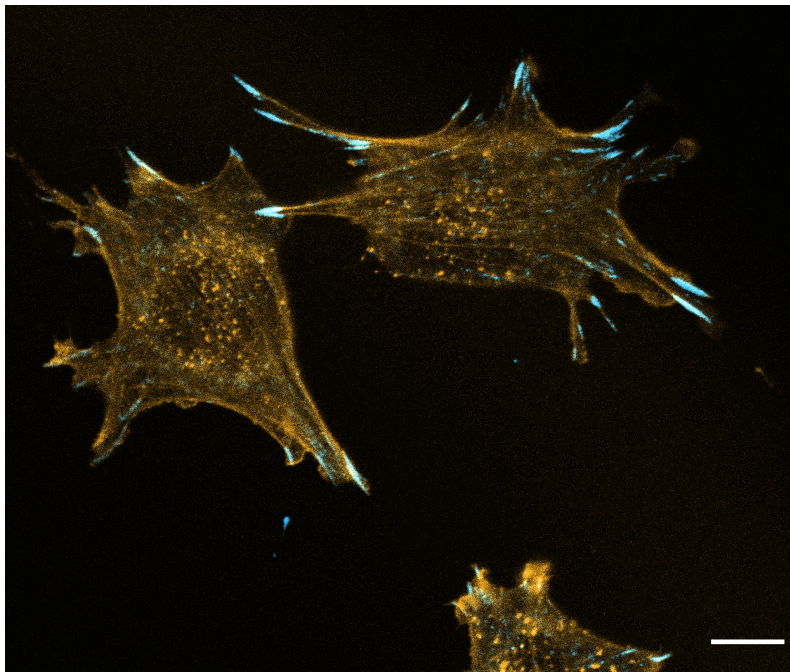


Abbildung 3: Konfokalmikroskopische Aufnahme von MEF-Zellen. Die Besonderheit von MEF-Zellen, und allgemein Bindegewebszellen, liegt in der ausgeprägten Ausbildung der Lamellipodien. Die stark ausgebildeten fokalen Adhäsionen sind hier durch eine Antikörpermarkierung der pFAK, in blau dargestellt, zu erkennen. Die Aktinstränge des Zytoskeletts wurden durch Phalloidin angefärbt und sind hier orangefarben dargestellt.
Größenbalken = 10 μm

Als 2D-Zellkultur bezeichnet man sämtliche Systeme, bei denen die Zellen auf einer planaren, rigiden Oberfläche wachsen und mit Medium überlagert werden. Grundsätzlich unterscheidet man die Dimensionalität der Zellkultur anhand der räumlichen Ausbreitungsmöglichkeit der Zellen. Während in einer 2D-Zellkultur eine adhärente Ausbreitung grundsätzlich nur in X- und Y-Richtung des Systems möglich ist, können sich Zellen in einer 3D-Kultur auch in Z-Richtung ausbreiten, da die Zellen beispielsweise in einem Kollagengel anstatt auf einer gläsernen Oberfläche kultiviert werden. In so einer 3D-Zellkultur bilden sich vermehrt sphärische Anhäufungen an Zellen aus [49, 50].

1.4.2 SW620

Die kanzerösen SW620-Zellen sind Darmkrebszellen der Dukes-Klasse C [51], extrahiert aus metastasierendem Gewebe aus Lymphknoten eines männlichen Menschen. Die Dukes-Klassen werden nach den verschiedenen Stadien der Krebserkrankung klassifiziert. Im ersten Stadium (Dukes-Klasse A) ist der Krebs nicht sehr weit fortgeschritten und es besteht eine sehr hohe Heilungschance. Bei dem Stadium II (Dukes-Klasse B) handelt es sich ebenfalls noch um ein relativ geringes Ausbreiten des Tumors, weswegen auch hier hohe Heilungschancen bestehen. Das dritte Stadium (Dukes-Klasse C) zeichnet sich durch ein erstes Ausbreiten in die benachbarten Lymphknoten aus. Eine Metastasenbildung in anderen Organen oder Geweben liegt hier noch nicht vor. Erst im Stadium IV hat der Tumor auch dorthin gestreut; hier besteht nur eine geringe Heilungswahrscheinlichkeit.

Erstmals wurden diese Zellen von Leibovitz et al. 1979 etabliert [52]. Krebszellen werden allgemein in einer Vielzahl von Arbeiten verwendet, da sie, neben der offensichtlichen medizinischen Bedeutung in der Krebsforschung, immortalisierte Zellen sind. Es gibt allerdings neben der kanzerösen Immortalisierung von Zellen auch spontan immortalisierte Zellen (wie die in dieser Arbeit verwendeten MEF-Zellen), oder durch SV40-Viren induzierte Immortalität. Dennoch sind Krebszellen, wie HeLa, HEK oder auch die hier verwendeten SW620-Zellen, weit verbreitete Modelle in der Forschung.

Hauptsächlicher Grund für die Verwendung der SW620-Zelllinie in dieser Arbeit ist, neben dem Vergleich zwischen Bindegewebszellen (MEF) und Epithelgewebe (SW620), die Tatsache, dass es sich hierbei um Krebszellen handelt. Diese zeigen eine erhöhte Expression und Aktivität der FAK und eignen sich daher perfekt für eine Analyse dieses Proteins auf Einzelmolekülebene.

1.5 Präklinische Studien in der Pharmaforschung

Die Identifikation von potenziellen Medikamenten ist eine äußerst wichtige und langwierige Prozedur, bei der unterschiedlichste Parameter zu beachten sind. Eine der ersten und bedeutendsten Untersuchungen ist die 'Toxikologische Prüfung' des in Frage kommenden Wirkstoffes. Sie beinhaltet unter anderem die akute Toxizität, die Langzeitwirkungen, die Mutagenitätsprüfung und die Reproduktionstoxizität [53]. Allgemein unterscheidet man die Toxizität eines Wirkstoffes anhand diverser Konzentrationsangaben, wie beispielsweise dem Median der lethalen Dosis (LD_{50}), der die Konzentration bestimmt, bei der die Hälfte der Versuchsorganismen sterben. Zudem gibt es weitere wichtige Parameter in der toxikologischen Prüfung, beispielsweise die niedrigste Konzentration, bei der noch eine Schädigung des Organismus zu messen ist (LOAEL) oder die höchste Dosis, bei der keine Schädigung auch bei längerer Aufnahme bzw. Verabreichung mehr zu beobachten ist (NOAEL) [54]. All diese Parameter und Messungen haben allerdings eine gemeinsame Problematik; sie sind stark abhängig von der Sensitivität des Tests. Die letale Dosis bei einem Tierversuch zu ermitteln bedarf noch keiner sehr präzisen Methoden, im Gegensatz dazu ist das NOAEL einer Zellkultur deutlich schwieriger zu ermitteln, vor allem, wenn es unterschiedliche Wirkungen bei der Behandlung mit demselben Wirkstoff gibt. Umso wichtiger ist die ganzheitliche Untersuchung solcher potenziellen Kandidaten für spätere klinische Studien, im Idealfall unter so realistischen Bedingungen, wie möglich. Neben den etablierten *in vitro*-Methoden wie beispielsweise Durchflusszytometrie als Bindeaffinitätsstudie von Kandidaten an das Zielprotein oder auch Luciferase-Assays, als Vitalitätsstudie einer gesamten Zellkultur, werden *in vivo*-Methoden immer bedeutender, da sie wichtige Erkenntnisse zu den späteren, wesentlich teureren klinischen Phasen, beitragen können. Allerdings ist die Genauigkeit und Effizienz in präklinischen Medikamentenforschungen nicht nur eine Frage der Kosten. Die darauf folgenden klinischen Studien sind neben dem enormen finanziellen Aufwand auch sehr viel langwieriger. Insbesondere spielt die Sicherheit eine große Rolle, weil zu diesem Zeitpunkt erstmals Versuche an Patienten durchgeführt werden. Das bedeutet, dass eine Zunahme an Erkenntnissen in früheren Studien auf verschiedenen Ebenen spätere Forschung massiv beeinflussen und verbessern kann.

Bestenfalls sollte eine bessere Vorhersagbarkeit noch vor der Durchführung von Tierversuchen erreicht werden. Konkretes Ziel ist daher die vermehrte Verwendung von menschlichen Zellen und Geweben in einer möglichst realistischen Umgebung, einer 3D-Zellkultur mit den gleichen äußeren Parametern, wie echtes Gewebe oder Versuchstieren. Zusätzlich sind nicht invasive Tests von großer Bedeutung, um die Dynamik und Entwicklung durch die Messung nicht zu beeinflussen [21]. Idealerweise könnte hierdurch auch eine *live*-Untersuchung ermöglicht werden, und Endpunktbestimmungen verdrängen. Die Genauigkeit der Messungen ist ein ebenfalls essenzieller Bestandteil solcher Ziele, da sich die kleinsten molekularen Vorgänge als immer wichtiger herausstellen. Nicht nur in der hier gezeigten Arbeit an der FAK ist die Organisation

der Plasmamembran von großer Bedeutung. Sie ist der einzige Ort einer Zelle, an der sämtliche Kommunikation mit der ECM und anderen Zellen abläuft [55, 56, 57, 25, 17]. Dadurch kann eine Behandlung der Zelle, des Gewebes oder gar der Patienten in einem sehr sensitivem *read-out* an der Plasmamembran gemessen werden.

1.6 FAK-Inhibitoren

Da die FAK, wie zuvor beschrieben, unzählige, zum Teil noch unerforschte Aufgaben und Wirkungsweisen in der Zelle besitzt, gleichzeitig aber nachweislich eine höhere Expressionsrate und Aktivität in Krebszellen aufweist, ist dieses Protein das Ziel vieler unterschiedlicher Arbeiten in der Medikamentenforschung [44, 58, 59, 60, 61].

Eine der Hauptgründe für die Bearbeitung von FAK als mögliches Therapieziel ist die Beeinflussung der Expression und Aktivität von p53, einem sehr wichtigen Apoptosefaktor, der in Krebszellen gestört ist und somit den geplanten Zelltod verhindert.

In dieser Arbeit wurde allerdings eine andere, ebenfalls wichtige Wirkung der FAK betrachtet. Basierend auf vorangegangenen Publikationen [58, 62, 63, 64, 2], befasst sich diese Arbeit mit dem Einfluss von FAK-spezifischen Inhibitoren auf die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von kanzerösen Zelllinien. Die Inkubation der Zelllinien mit FAK-spezifischen Inhibitoren soll die Autophosphorylierung der FAK an Tyrosin 397 und damit den initialen Schritt hinsichtlich der Aktivierung des Proteins verhindern. In den Arbeiten von Golubovskaya et al. aus dem Jahre 2008 und 2012 wurden viele solcher Inhibitoren auf ihre Effizienz hin überprüft und analysiert [62, 58].

Ausgehend von den Publikationen werden die als äußerst spezifisch geltenden FAK-Inhibitoren Y11 (Abb. 4) und Y15 (Abb. 5) für die Experimente in dieser Arbeit ausgesucht. Somit wurden für diese Arbeit zwei Inhibitoren verwendet, die zuvor schon einmal im Fokus präklinischer Studien standen.

1.6.1 Y11

Der FAK-Inhibitor Y11, mit vollen chemischen Namen *1-(2-Hydroxyethyl)-3,5,7-triaza-1-azaniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane bromide*, wurde aufgrund der bereits bestehenden Arbeiten an ihm sowie der validierten Spezifität für FAK gegenüber anderen Kinasen für diese Arbeit ausgewählt. Das Molekulargewicht dieses kleinen Moleküls beträgt 265.15 g/mol. Er wurde 2012 von Golubovskaya et al. identifiziert und beschrieben sowie auf viele Charakteristiken, beispielsweise bezüglich der Spezifität und *in vitro*-Wirkungen, hin überprüft [62]. In dieser Arbeit wurde die Bindung von 140.000 Kandidaten an die Kristallstruktur der Kinasedomäne der FAK mittels DOCK 5.1 getestet, wobei sich Y11 als äußerst vielversprechend herausstellte. Insgesamt wurden hier nicht nur die Viabilitäten der Zelllinien SW620 und BT474 nach der Behandlung getestet, sondern auch die prozentuale Ablösung der Zellen bei steigender Konzentration. Bei der Zelllinie BT747 handelt es sich ebenfalls um kanzeröse Zellen, die allerdings aus dem Brustgewebe eines weiblichen Menschen gewonnen wurden.

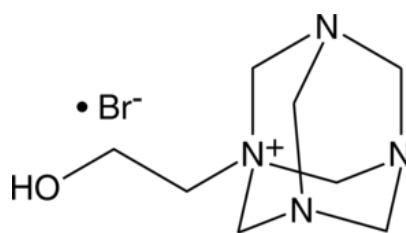


Abbildung 4: Der FAK-spezifische Inhibitor Y11. Das Molekulargewicht dieses kleinen Moleküls beträgt 265.15 g/mol. Es bindet spezifisch an der Bindetasche am Tyrosin 397 der FAK und verhindert somit die Autophosphorylierung des Proteins.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit ebenfalls die Zellantwort bezüglich der Adhäsion beinhaltet, sind diese vorangehenden Erkenntnisse von großem Wert. Durch die Arbeiten von Golubovskaya et al. 2012 wurde der *in vitro* IC_{50} -Wert dieses Inhibitors auf 50 nM für die Kinasedomäne ermittelt [62]. Dieser Wert dient als Grundlage für die gewählten Konzentrationen in den hier dargestellten Experimenten.

1.6.2 Y15

Der FAK-Inhibitor 14, oder auch Y15, ist ebenfalls ein membrangängiger und spezifischer FAK-Inhibitor, der die Autophosphorylierung der FAK am Tyrosin 397 blockiert [58, 61]. Der volle chemische Name lautet 1,2,4,5-Benzenetetramine tetrahydrochloride.

Ähnlich der Untersuchungen von Y11 sind hier sowohl die Apoptose- als auch Ablöserate der Zellen bestimmt worden. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine SW620 sondern BT474-Zellen verwendet. Genau wie schon Y11 zuvor, wurde der Inhibitor Y15 von Golubovskaya et al. durch sogenanntes *computational docking* mittels DOCK 5.1 an der Kristallstruktur von FAK ermittelt.

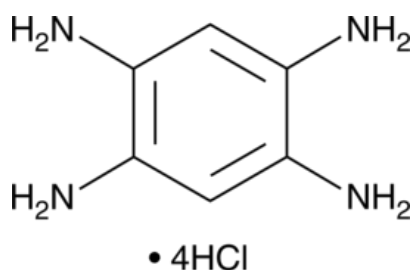


Abbildung 5: Der FAK-Inhibitor Y15. Das Molekulargewicht dieses kleinen Moleküls beträgt 284.01 g/mol.

In der Publikation von Golubovskaya et al., 2008, konnte in einem *in vitro*-Assay der Kinaseaktivität ein IC_{50} von 1 μ M ermittelt werden [58]. Auch dieser Wert dient als Grundlage für alle Konzentrationen, mit denen die Zellen in dieser Arbeit behandelt werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Analyse der FAK auf molekularer Ebene durch Einzelmolekülmikroskopie nach Behandlung mit kommerziell erhältlichen Inhibitoren, welche als Beispiel für potenzielle Medikamente dienen. Durch die erhöhte Auflösung sollen einzelne FAK-Moleküle detektiert werden, um deren Anzahl und Dichte zu analysieren und die damit verbundenen Eigenschaften der FAK und deren Verhalten bezüglich der Cluster zu charakterisieren. In Abbildung 6 ist das Vorgehen der Arbeit dargestellt.

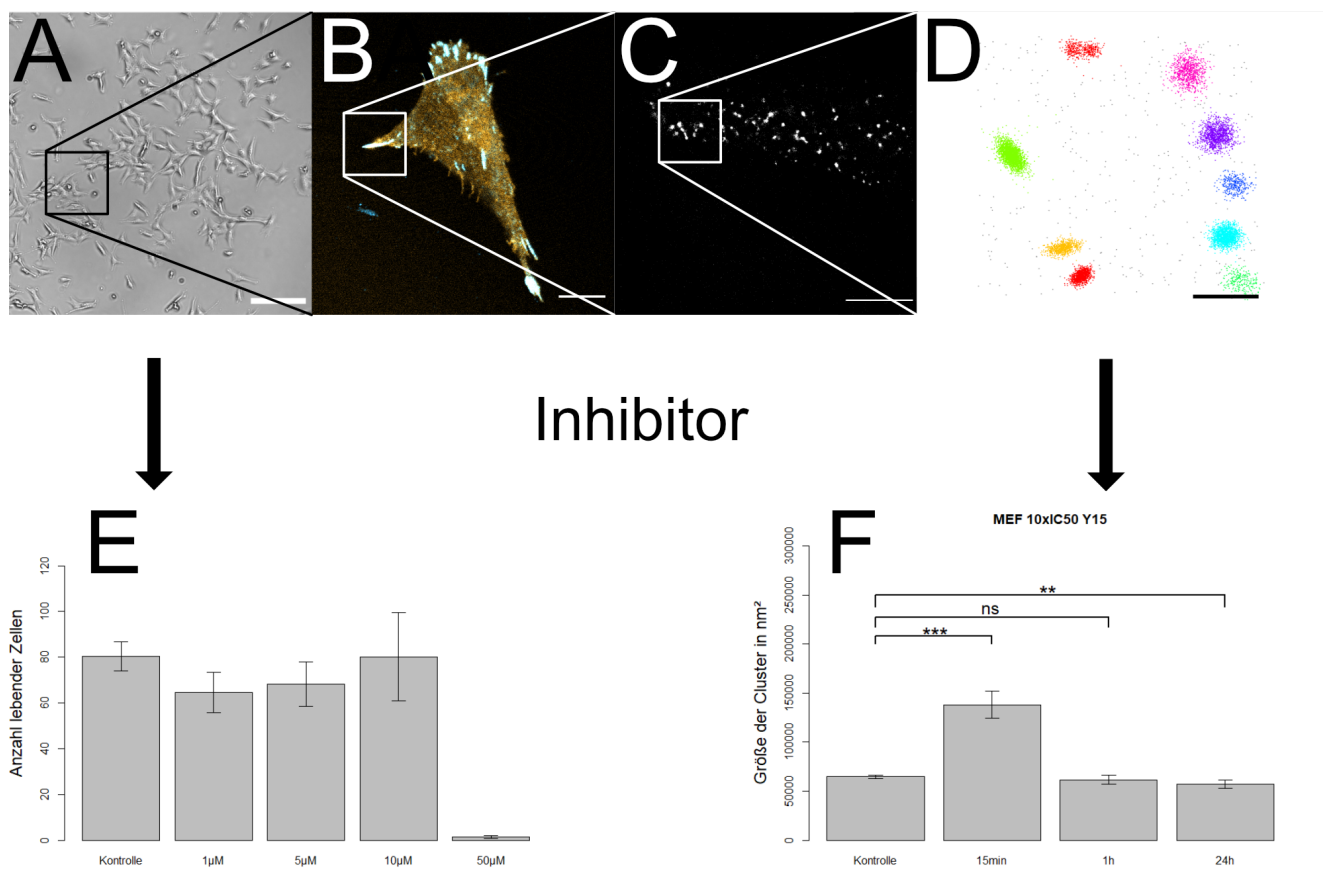



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kapiteleinteilung des Ergebnisteils. Die mikroskopische Aufnahme der Lebendzellanalyse (A) zeigt einen groben Überblick über die gesamte Zellkultur eines Experiments und resultiert in Balkendiagrammen (E), um die Wirkung eines Inhibitors auf die gesamte Zellkultur zu analysieren. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der MEF-Zellen (B) dienen als Brücke zwischen der Analyse ganzer Zellkulturen und der Detektion einzelner Proteine. Außerdem wurden so die Strukturproteine einer fokalen Adhäsion und deren Kolo-kalisation überprüft sowie die Spezifität des pFAK-Antikörpers gezeigt. Die Einzelmolekülmikroskopie resultiert zunächst in Positionsdaten detektierter pFAK-Signale (C), die dann in eine automatisierte Clusteranalyse überführt werden kann. Hierdurch können die einzelnen Cluster identifiziert und charakterisiert werden (D). Schließlich können sämtliche Analysen in zusammengefassten Balkendiagrammen dargestellt werden, um den Effekt der beiden hier getesteten Inhibitoren auf die Zelltypen MEF und SW620 zu ermitteln (F).

Größenbalken: A = 200 µm, B = 10 µm, C = 5 µm, D = 1 µm



Gleichzeitig sollen konventionelle Tests, wie Lebendzellassays, angefertigt werden, um die erhobenen Daten und deren Analyse in die bestehende Literatur einarbeiten zu können. Zudem dient der Vergleich von inhibitorischen Wirkungen auf Zellkultur- und Einzelmolekülebene als Test für die Sensitivität des neu etablierten Systems.

2 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterteilen sich in die verschiedenen experimentellen Aufbauten der Lebendzellanalyse, Konfokalmikroskopie und Einzelmolekülmikroskopie. Zu Beginn wurden die FAK-Inhibitoren Y11 und Y15 hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Zellüberleben getestet. Hierfür wurden sowohl Lebendzell- als auch Zellkernfärbungen angefertigt, um die Überlebensrate in einer ganzen Population zu beobachten.

Als Übergang zu der intrazellulären Analyse der inhibitorischen Wirkung auf Einzelmolekülebene wurden Antikörpermarkierungen von wichtigen in fokalen Adhäsionen beteiligten Molekülen angefertigt und mittels Konfokalmikroskopie aufgenommen. Somit konnte der Aufbau einer fokalen Adhäsion, insbesondere hinsichtlich der Beteiligung wichtiger Proteine, nachvollzogen werden. Zudem dienen die Aufnahmen der fokalen Adhäsionen, und im speziellen die Markierung der pFAK, dem Verständnis, wie dieses Protein in ihrer nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Form in der Zelle verteilt ist.

Vor der Analyse und Auswertung der gemessenen Einzelmoleküldaten, wurden die erhobenen Daten durch simulierte Einzelmolekülaufnahmen verifiziert. Dafür konnten *in silico* optisch und technisch ähnliche Daten erzeugt werden, die mit den verschiedenen Auswertemethoden zur Clustercharakterisierung analysiert wurden. Der Grund hierfür ist, dass bei einer solchen Auswertung die zugrundeliegenden Parameter der Rohdaten bekannt sind, im Gegensatz zu den realen Messdaten. Daher konnten die verschiedenen Auswertungen, genauer im Kapitel 2.3.1 beschrieben, auf ihre Genauigkeit und Korrektheit hin überprüft werden.

Das letzte Kapitel der Ergebnisse beschäftigt sich mit der detaillierten Analyse der pFAK auf Einzelmolekülebene und fasst die daraus entstehenden Erkenntnisse zusammen. Hier wurden einzelne Proteine detektiert und deren Anzahl und Dichte innerhalb der fokalen Adhäsionen, und genauer in pFAK-Cluster, analysiert und charakterisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen der FAK-Inhibitoren Y11 und Y15 basieren auf zwei Publikationen von Golubovskaya et al. [58, 62]. Die hier gewählten Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren sind jeweils ein Vielfaches (1x, 5x, 10x und 50x) des in den Arbeiten von Golubovskaya et al. ermittelten IC_{50} Wertes des jeweiligen Inhibitors.

2.1 Einfluss der Inhibitoren Y15 und Y11 auf das Überleben von MEF- und SW620-Zellen

Obwohl sich diese Arbeit hauptsächlich mit der Einzelmolekülmikroskopie beschäftigt, ist es dennoch unabdingbar, die eingesetzten Inhibitoren ebenfalls auf ihren Effekt bezüglich der Viabilität der Zellen zu überprüfen. Erste Experimente beschäftigten sich daher mit den Färbungen und mikroskopischen Aufnahmen lebender MEF- und SW620-Zellen bei Inkubation nach Zugabe der FAK Inhibitoren Y11 und Y15.

Im Folgenden sind die Effekte der Inhibitoren auf das Überleben der beiden Zelltypen MEF und SW620 bei den unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Wie auch schon Golubovskaya et al. 2008 und 2012 nachwies, beschränkt sich die Wirkung der beiden als sehr spezifisch beschriebenen Inhibitoren, je nach Konzentration, nicht nur auf die Inhibition der Kinasedomäne der FAK, sie verändert auch die Adhäsion und Viabilität der Zelle [58, 62]. Allerdings variieren diese Effekte bei unterschiedlichen Zelltypen stark. Zu erwähnen ist noch, dass die gezeigten mikroskopischen Ausschnitte in Abbildung 7-11 jeweils nur etwa 5% eines einzelnen Bildes zeigen. Für alle Lebendzellfärbungen wurden fünf Ausschnitte des Deckglases mit jeweils 10-800 Zellen (je nach Konzentration variierte die Zelldichte deutlich) gemessen. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal wiederholt.

2.1.1 Einfluss von Y15 auf lebende Zellen

In Abbildung 7 ist der Effekt von Y15 auf MEF-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit steigender Konzentration zu sehen. Die Färbung der lebenden Zellen wurde mittels Calcein RedTM durchgeführt, da dieser Farbstoff in Zellen verstoffwechselt werden muss, bevor er fluoresziert. Er eignet sich daher gut für Lebendzellfärbungen. Alle auf dem Deckglas befindlichen Zellen wurden durch Hoechst 33342 gefärbt, da dieser Farbstoff sämtliche DNA anfärbt und somit keinen Unterschied zwischen lebenden und toten Zellen macht (siehe Kapitel 4.2.2).

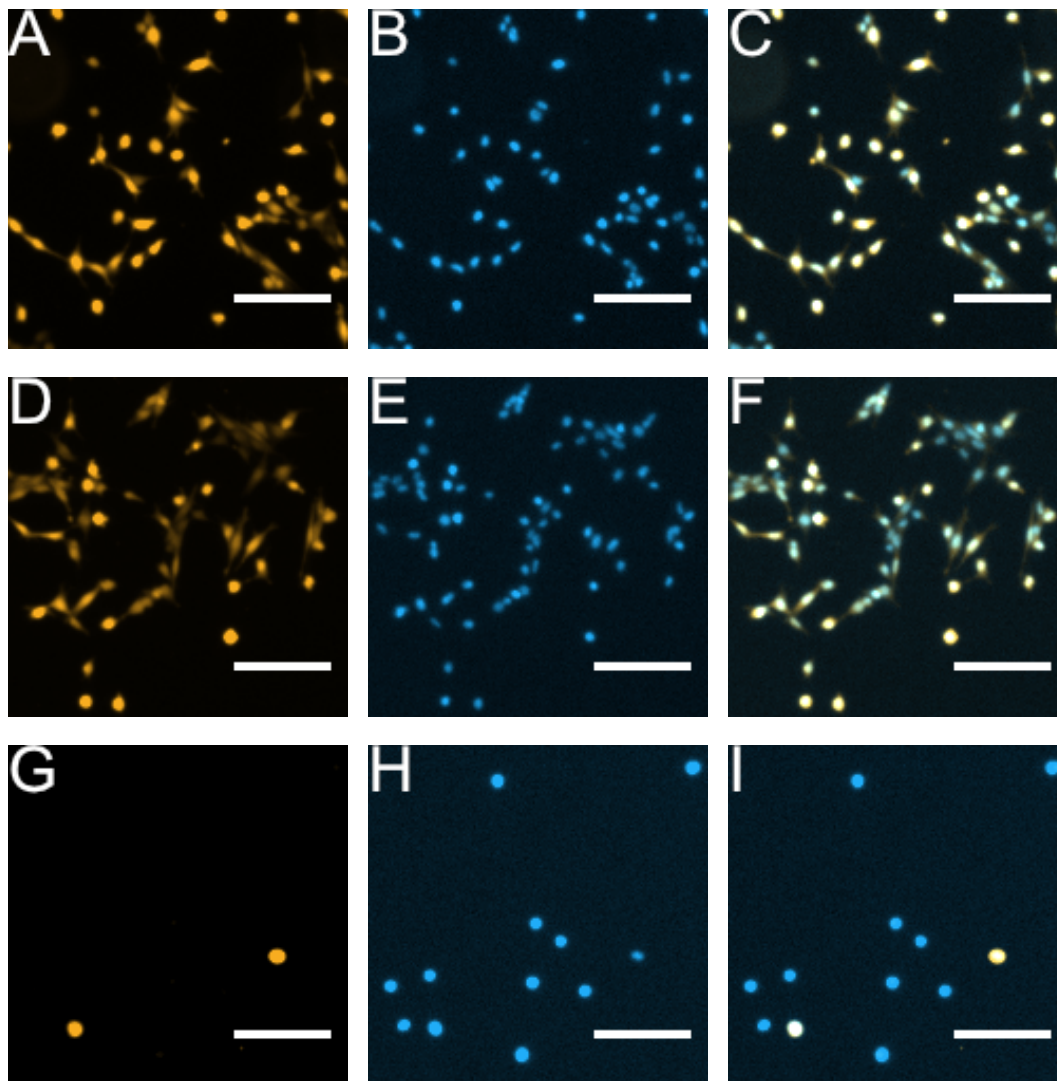


Abbildung 7: MEF-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y15. A-C = Kontrolle; D-F = 5 μM ; G-I = 50 μM . Die Calcein RedTM-Färbung (A, D, G) zeigt ausschließlich lebende Zellen, da der Farbstoff erst verstoffwechselt werden muss, um fluoreszent zu sein. Die Hoechst 33342-Färbung (B, E, H) hingegen färbt alle Zellkerne sowohl von lebenden als auch toten Zellen, da dieser Farbstoff lediglich DNA anfärbt. Die Bilder (C, F, I) zeigen die vorangehenden Farbkanäle übereinander gelegt, um die toten und lebenden adhärennten Zellen zu unterscheiden. Bei der Inkubation mit 5 μM des Inhibitors ist auf den ersten Blick kein direkter Effekt zu beobachten. Bei 50 μM sind deutlich weniger Zellen auf dem Deckglas zu sehen und die Rate an lebenden Zellen ist sehr niedrig. Größtenbalken = 125 μm

Die Färbung mit Calcein RedTM dient der Lebendzellsfärbung und ist in der oben gezeigten Abbildung orangefarben markiert (A, D, G). Der selbe Bildausschnitt wurde ebenfalls mit Hoechst 33342 gefärbt, hier in blau dargestellt, um die Gesamtzellzahl zu bestimmen (B, E, H). In (C, F, I) wurden diese beiden Farbkanäle zusammengelegt, um die Rate von toten und lebenden Zellen optisch besser beurteilen zu können. Die Kontrolle (A-C) zeigt wie erwartet eine sehr geringe Rate an abgestorbenen Zellen. Bei einer Behandlung über 24 Stunden mit einer Konzentration von 5 μ M sieht man in diesem Beispielbild (D-F) ebenfalls nur eine geringe Rate an toten Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle ist diese allerdings etwas erhöht. Nach 24-stündiger Inkubation mit 50 μ M des Inhibitors Y15 ist zu erkennen, dass sich sowohl die meisten Zellen vom Deckglas gelöst haben als auch, dass der Großteil der sich noch auf der Oberfläche befindlichen Zellen tot ist.

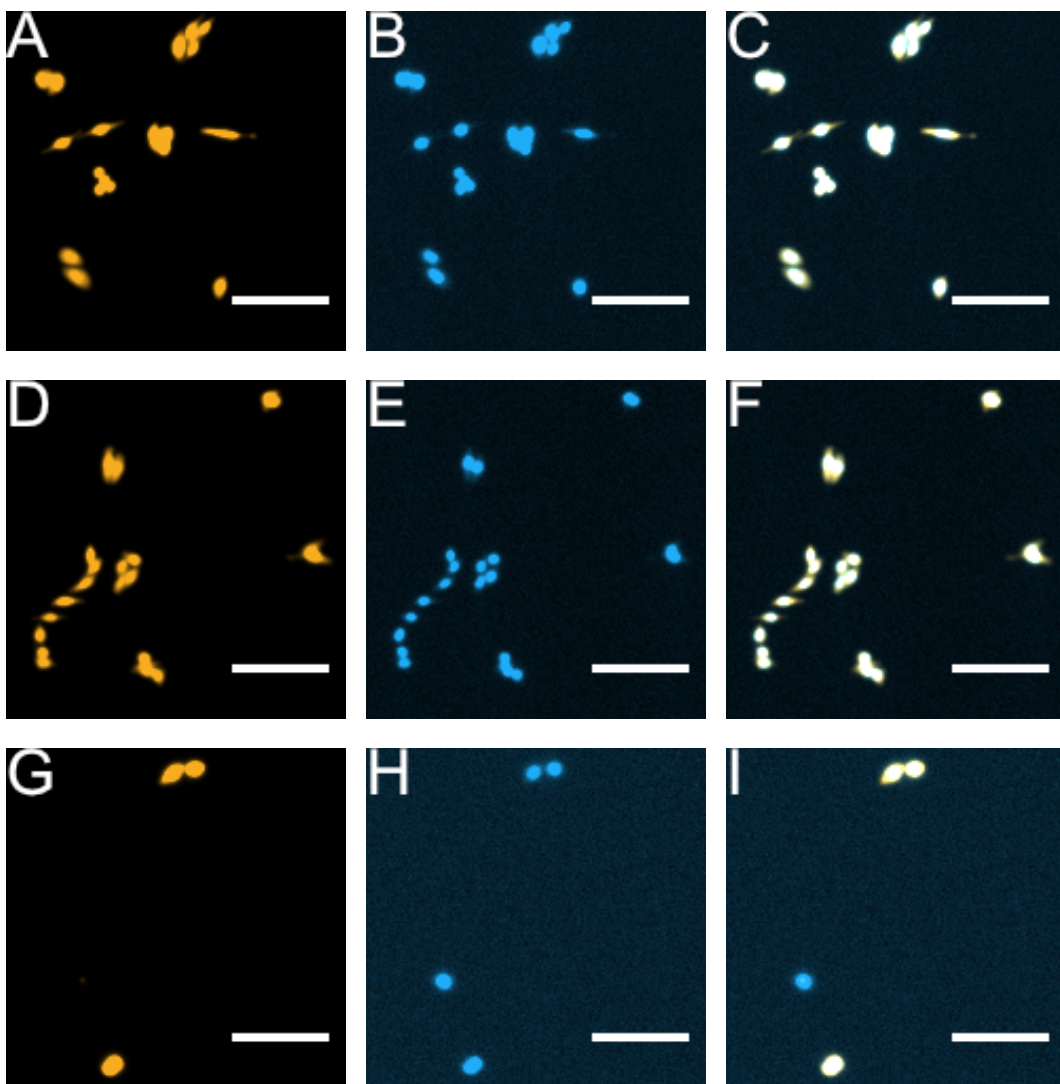


Abbildung 8: SW620-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y15. A-C = Kontrolle; D-F = 50 nM Y15; G-I = 2.5 μ M Y15. Die Calcein RedTM-Färbung (A, D, G) zeigt ausschließlich lebende Zellen. Die Hoechst 33342-Färbung (B, E, H) hingegen färbt alle Zellkerne sowohl von lebenden als auch toten Zellen. Die Bilder (C, F, I) zeigen die vorangehenden Farbkanäle übereinander gelegt, um die toten und lebenden adhärennten Zellen zu unterscheiden.
Größenbalken = 125 μ m

Bei der Behandlung von SW620-Zellen gibt es optisch große Ähnlichkeiten zu den mikroskopischen Aufnahmen der MEF-Zellen. Hier ist ebenfalls keine Sterberate in der Kontrolle zu sehen. Der Effekt nach 24 Stunden mit einer 5 μM Inkubation des Inhibitors Y15 ist noch geringer, als er bei MEF-Zellen zu beobachten ist. Es gibt hier keinen messbaren Unterschied zur Kontrolle. Nach einer Behandlung mit 50 μM Y15 ist nach 24 Stunden allerdings ebenfalls eine hohe Rate an abgelösten Zellen zu beobachten. Zusätzlich wurden auch hier viele noch auf dem Deckglas befindliche Zellen als tot identifiziert, wenn auch weniger im Vergleich zu dem Versuch mit MEF-Zellen.

In der gesamten Auswertung von MEF- und SW620-Zellen wurde das Zellüberleben nach einer Inkubationszeit von einer bzw. 24 Stunden mit den Konzentrationen 1, 5, 10 und 50 μM analysiert (Abb. 9).

Bei den hier verwendeten MEF-Zellen verringert sich nach einstündiger Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors Y15 die Überlebensrate deutlich. Der Rückgang an lebenden Zellen nach einer Stunde ist bei steigender Konzentration in Abbildung 9(A) deutlich zu sehen. Die durch Literatur gestützte Erwartung, dass bei steigender Konzentration das Zellüberleben abnimmt, konnte hier gut gezeigt werden. Allerdings sind bei den MEF-Zellen starke Schwankungen zu verzeichnen, was sich in den großen Fehlerbalken widerspiegelt und die scheinbare Erhöhung der Viabilität bei 50 μM erklärt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden scheint sich der initiale Rückgang an lebenden Zellen weitestgehend erholt zu haben. Einzige Ausnahme bildet hier der Maximalwert von 50 μM , bei dem die Zellen nahezu vollständig abgetötet und/oder abgelöst wurden (9B).

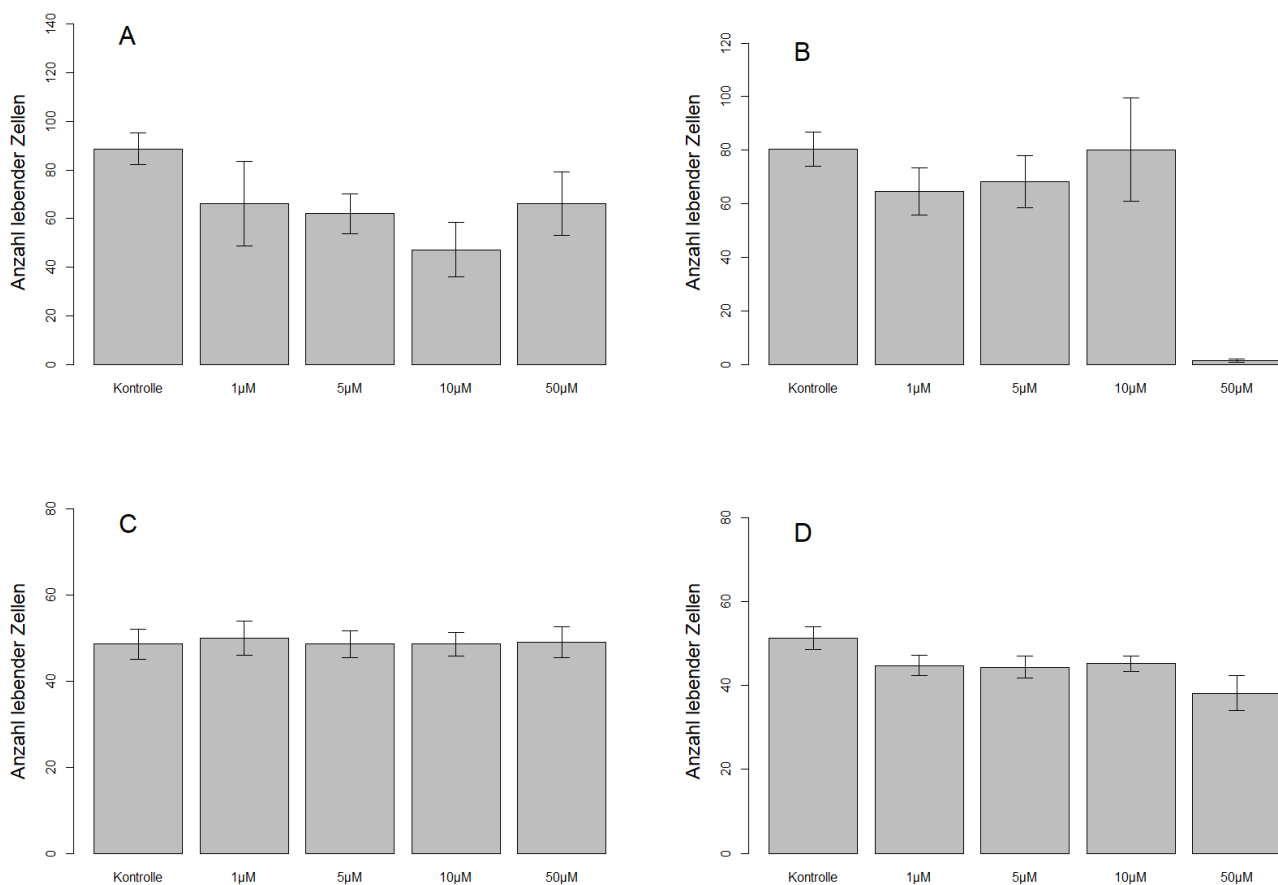


Abbildung 9: Lebendzellfärbung mittels Calcein RedTM nach einer oder 24 Stunden Inkubation (MEF = A-B; SW620 = C-D) mit dem Inhibitor Y15. Obwohl bei einer einstündigen Inhibition mit Y15 ein Effekt der Lebensfähigkeit zu beobachten ist, scheinen sich diese Effekte nach 24 h weitestgehend zu kompensiert worden zu sein. Lediglich bei hohen Dosen (ab 50 µM) ist die Überlebensrate von MEF-Zellen verschwindend gering. Bei der Krebszelllinie gibt es keinen kurzzeitigen Effekt nach einer einstündigen Inkubation. Nach 24 h scheint es leichte Effekte zu geben, die ab einer Dosis von 50 µM deutlich zunehmen.

Dieser Effekt ist auch in Abbildung 7(G-I) zu sehen. In diesem Ausschnitt eines mikroskopischen Bildes ist der massive Rückgang an lebenden und adhärennten Zellen zu sehen.

Bei der hier verwendeten kanzerösen Zelllinie SW620 gibt es einen deutlich geringeren Effekt bei gleichen Inkubationszeiten und Konzentrationen mit dem Inhibitor Y15 (Abb. 8). Dies ist nicht nur in der gezeigten mikroskopischen Aufnahme zu sehen, es zeigt sich auch in der Gesamtstatistik des Versuches (Abb. 9). Es gibt keinen messbaren Unterschied zwischen der Kontrolle und den verwendeten Konzentrationen nach einer einstündigen Inkubation mit Y15. Bei einer 24-stündigen Behandlung ist nur ein minimaler Effekt zu sehen, der ab einer Konzentration von 50 µM stärker zunimmt. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Daten aus den oben genannten Publikationen vereinen und werden nochmals im Kapitel 3.3 aufgegriffen.

2.1.2 Einfluss von Y11 auf lebende Zellen

Wie in Kapitel 2.1.1 wurden die hier gezeigten Markierungen mittels Calcein RedTM (orange-farben) und Hoechst 33342 (blau) durchgeführt. In Abbildung 10 sieht man, dass die Kontrolle der MEF-Zellen eine unveränderte Zellzahl und Überlebensrate zeigt (A-C). Verglichen mit der Behandlung mit Y15 ist auch bei der Inkubation mit dem 5-fachen des ermittelten IC₅₀-Wertes (250 nM) nach 24 Stunden nahezu kein Effekt zu beobachten (D-F). Nach 24-stündiger Behandlung mit dem 50-fachen IC₅₀ des Inhibitors Y11 (2.5 μ M) ist ebenfalls kaum eine Ablösung der Zellen zu beobachten, allerdings ist die Viabilität deutlich zurück gegangen, was an einer vermehrten Anzahl blau angefärbter Zellen zu erkennen ist, da Hoechst 33342 (hier in blau dargestellt) alle Zellen färbt, Calcein RedTM (orange-farben) hingegen nur lebende Zellen färbt.

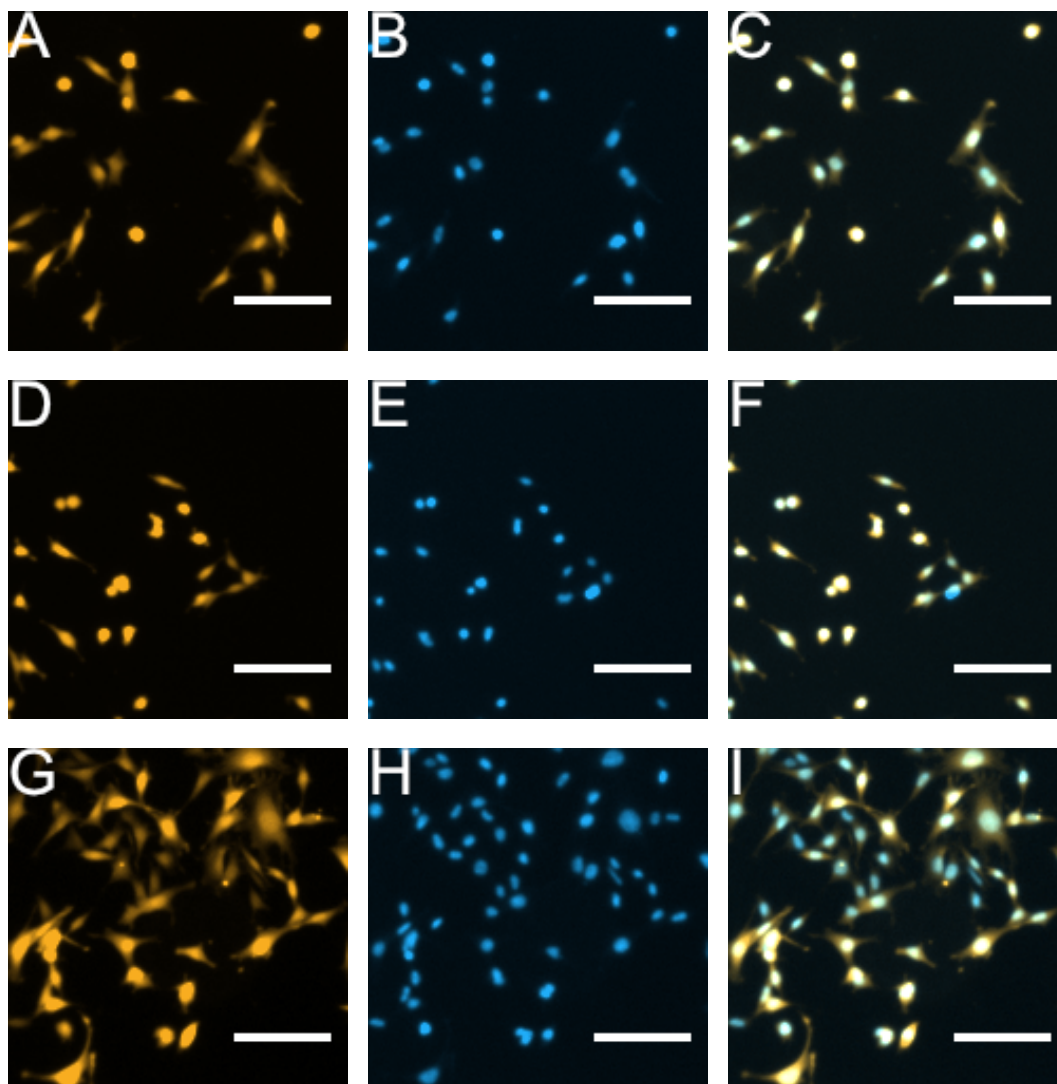


Abbildung 10: MEF-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y11. A-C: Kontrolle nach 24 Stunden. D-F: 250 nM Y15 nach 24 Stunden. H-I: 2.5 μ M Y15 nach 24 Stunden. Die Calcein RedTM-Färbung (A, D, G) zeigt ausschließlich lebende Zellen. Die Hoechst 33342-Färbung (B, E, H) hingegen färbt alle Zellkerne sowohl von lebenden als auch toten Zellen an. Die Bilder (C, F, I) zeigen die vorgehenden Farbkanäle übereinander gelegt, um die toten und lebenden adhärenen Zellen zu unterscheiden. Größenbalken = 125 μ m

Bei der Behandlung und Inkubation von SW620-Zellen unter den selben Bedingungen, ist ebenfalls ein geringerer Effekt, im Vergleich zu der Behandlung mit Y15, zu sehen (Abb. 11). In der Kontrolle (A-C) ist wie erwartet keine Ablösung und kein Zelltod zu beobachten. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit 250 nM des Y11-Inhibitors ist ebenfalls kein Effekt und dadurch kein Unterschied zur Kontrolle zu sehen. Interessant ist der ausbleibende Effekt selbst bei höheren Konzentrationen wie 2.5 μ M des Inhibitors Y11. Hier ist auf den gezeigten Beispielbildern weder eine Ablösung noch eine Verringerung der Viabilität zu erkennen.

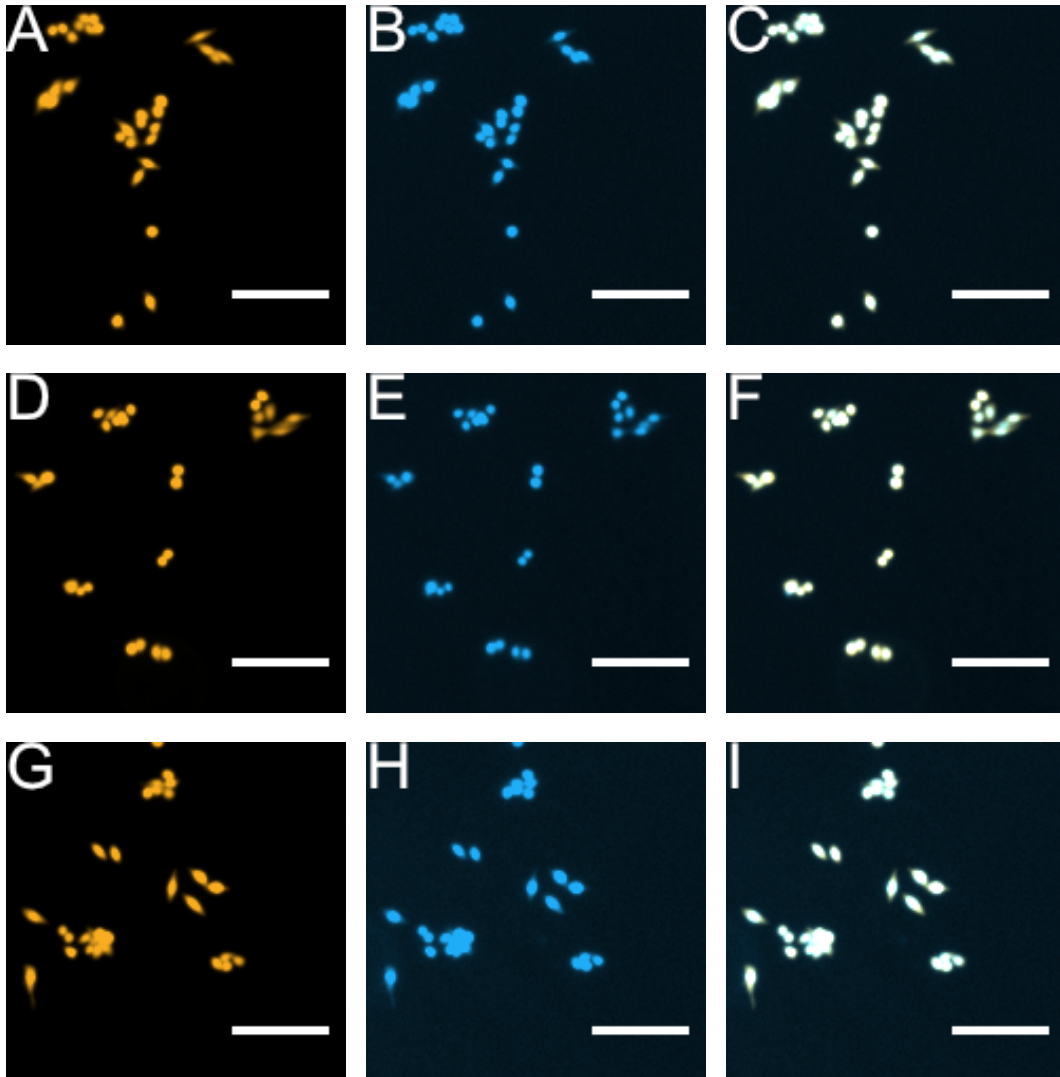


Abbildung 11: SW620-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y11. A-C: Kontrolle nach 24 Stunden. D-F: 250 nM Y15 nach 24 Stunden. H-I: 2.5 μ M Y15 nach 24 Stunden. Die Calcein RedTM-Färbung (A, D, G) zeigt ausschließlich lebende Zellen. Die Hoechst 33342-Färbung (B, E, H) hingegen färbt alle Zellkerne, sowohl von lebenden als auch toten Zellen. Die Bilder (C, F, I) zeigen die vorangehenden Farbkanäle übereinander gelegt, um die toten und lebenden adhärennten Zellen zu unterscheiden.
Größenbalken = 125 μ m

Jedoch zeigt sich in der Gesamtstatistik ebenfalls eine deutlich messbare Wirkung des Inhibitors. Diesmal, im Unterschied zur Behandlung mit Y15, ist auch bei einer einstündigen Inkuba-

tionszeit bereits ein Effekt bei hohen Konzentrationen zu messen (Abb. 12C). Bei 24-stündiger Behandlung scheint es allerdings bis auf eine geringe Abnahme der Viabilität ab 250 nM keinen weiteren Effekt mehr zu geben. Analog zu dem Vergleich mit der Literatur und den Ergebnissen der Y15 Behandlung, kann auch hier diskutiert werden, dass der Versuchsaufbau sich unterscheidet, andere Zellen verwendet wurden und je nach Versuch auch höhere molare Konzentrationen getestet wurden.

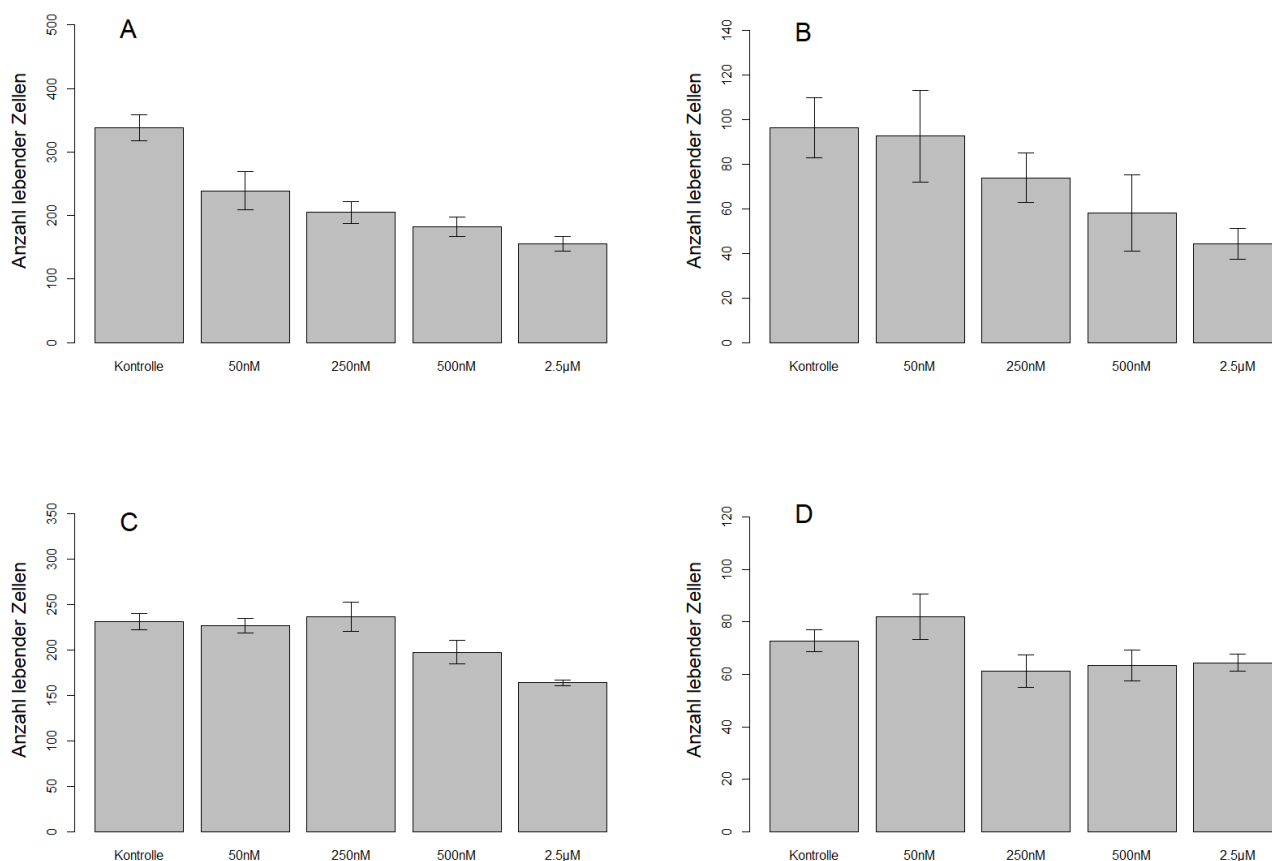


Abbildung 12: Lebendzellfärbung mittels Calcein RedTM nach einer oder 24 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor Y11 (MEF = A-B; SW620 = C-D; 1h = A+C; 24h = B+D). Der Effekt des Inhibitors Y11 auf die Überlebensfähigkeit von MEF-Zellen ist schon nach einer Stunde deutlich zu sehen und verändert sich kaum über die Zeit von 24 Stunden. In beiden Zeiträumen ist eine Verringerung der Überlebensrate von ungefähr 50% zu verzeichnen. Bei SW620-Zellen entsteht ein Rückgang der Viabilität bei höheren Konzentrationen ebenfalls bereits nach einer Stunde Inkubation mit dem Inhibitor. Nach 24 Stunden scheinen sich die kanzerösen Zellen jedoch zu erholen, hier gibt es nur minimale Effekte zu beobachten.

Die Behandlung mit dem FAK-Inhibitor Y11 zeigt deutliche Unterschiede sowohl zwischen Kontrolle und Behandlung als auch zu dem Versuch mit Y15. Bei der Inkubation von MEF-Zellen mit Y11 scheint der Effekt gleichmäßiger und im direkten Vergleich mit der Wirkung von Y15, stärker zu sein. Obwohl man optisch keinen unmittelbaren Effekt erkennt (Abb. 10), ist in der

Gesamtstatistik des Versuches ein deutlicher Rückgang an lebenden MEF-Zellen zu beobachten. Hier ist ein mit der jeweiligen Konzentration einhergehender gleichmäßiger Rückgang der Viabilität zu beobachten, sowohl bei einstündiger, als auch bei 24-stündiger Inkubationszeit (Abb. 12A-B). Ein interessanter Unterschied zwischen den Inhibitoren Y15 und Y11 liegt offenbar in der Langzeitwirkung vor, zumindest bei den hier gemessenen MEF-Zellen. Bei einstündiger Behandlung sind die Wirkungen sehr ähnlich und können miteinander verglichen werden. Allerdings hebt sich der initiale Rückgang an lebenden Zellen bei der Behandlung mit Y15 auf, während er bei Y11 weiter anhält. Es gilt zu bedenken, dass die Konzentrationen zwar die gleichen Multiplikatoren des jeweiligen IC_{50} -Wertes sind, es dadurch jedoch zu molaren Konzentrationsunterschieden kommt, da sich die beiden IC_{50} -Werte deutlich unterscheiden.

2.2 Konfokalmikroskopie und Auswahl der Antikörper

Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit der mikroskopischen Aufnahme von MEF-Zellen am Konfokalmikroskop und genauer mit der Betrachtung von fokalen Adhäsionen. Hierfür wurden diverse Proteine, die eine Rolle an und in fokalen Adhäsionen spielen, durch Antikörper markiert. Dies dient sowohl zur Untersuchung der Spezifität der genutzten Antikörper, als auch zum Nachvollziehen des Aufbaus der in der Einleitung beschriebenen Adhäsion am Beispiel der MEF-Zellen. Dieses Kapitel beschäftigt sich ebenfalls mit der Validierung des Färbeprotokolls, welches für die Einzelmolekülmikroskopie verwendet wird und somit essenziell ist.

Im Folgenden sind daher diverse Kollokalisierungen unterschiedlicher Adhäsions- und Strukturproteine zu sehen (Abb. 13). Die Markierungen der einzelnen Proteine sind in der jeweiligen Farbe in den Bildern gekennzeichnet, die übereinandergelegten Aufnahmen (C,F,I) zeigen die einzelnen Kollokalisierungen der Aufnahme in weiß.

Mit Hilfe der Antikörpermarkierungen konnte der Aufbau einer fokalen Adhäsion im Konfokalmikroskop dargestellt werden, da die einzelnen Markierungen von dem Äußeren der Zelle bis weit in das Zytosol reichen.

In Abbildung 13(A) ist zunächst die FAK, in blau markiert, dargestellt. Auf der Unterseite der Zelle konnten vor allem an den Randbereichen gehäufte Signale detektiert werden. Im Zytosol sind deutlich weniger und zerstreutere Markierungen zu erkennen. Dies deutet auf die hauptsächlich Anwesenheit von FAK an den fokalen Adhäsionen hin. In Abbildung 13(B) ist eine Aktinfärbung der gleichen Zelle zu sehen. Hier sind die Stränge, welche von den fokalen Adhäsionen ins Zellinnere verlaufen, deutlich sichtbar. Bei einer Überlagerung der Farbkanäle ist eine deutliche Kollokalisierung zu erkennen, wobei die FAK meist noch weiter an der Zellmembran als die Aktinstränge zu liegen scheint, was ebenfalls der Literaturangaben und der schematischen Darstellung in Abbildung 1 entspricht.

Als nächste Markierung wurde die phosphorylierte Form der FAK gewählt, hier ebenfalls in blau dargestellt (Abb. 13D). Bei dieser Aufnahme ist der Unterschied zwischen den fokalen Adhäsionen und dem Zytosol noch stärker ausgeprägt. Es sind nur noch vereinzelte schwache Signale innerhalb der Zelle zu erkennen, wobei die stärker ausgeprägten Adhäsionen der Zelle nahezu vollständig markiert wurden. Bei dieser Kollokalisierung wurde die Integrin-Untereinheit $\beta 1$, hier orangefarben dargestellt, markiert. Auch hier ist eine deutliche Färbung der fokalen Adhäsionen zu beobachten, wobei auch einige Signale im Zytosol vorliegen, diese jedoch nicht geclustert sind. In der Überlagerung der Kanäle ist ebenfalls eine starke Kollokalisierung, in weiß dargestellt, zu beobachten. Hier ist deutlich eine gemeinsame Anhäufung der beiden Proteine innerhalb der fokalen Adhäsionen der Zelle zu beobachten. Im Zytosol ist dagegen nahezu keine Kollokalisierung zu erkennen.

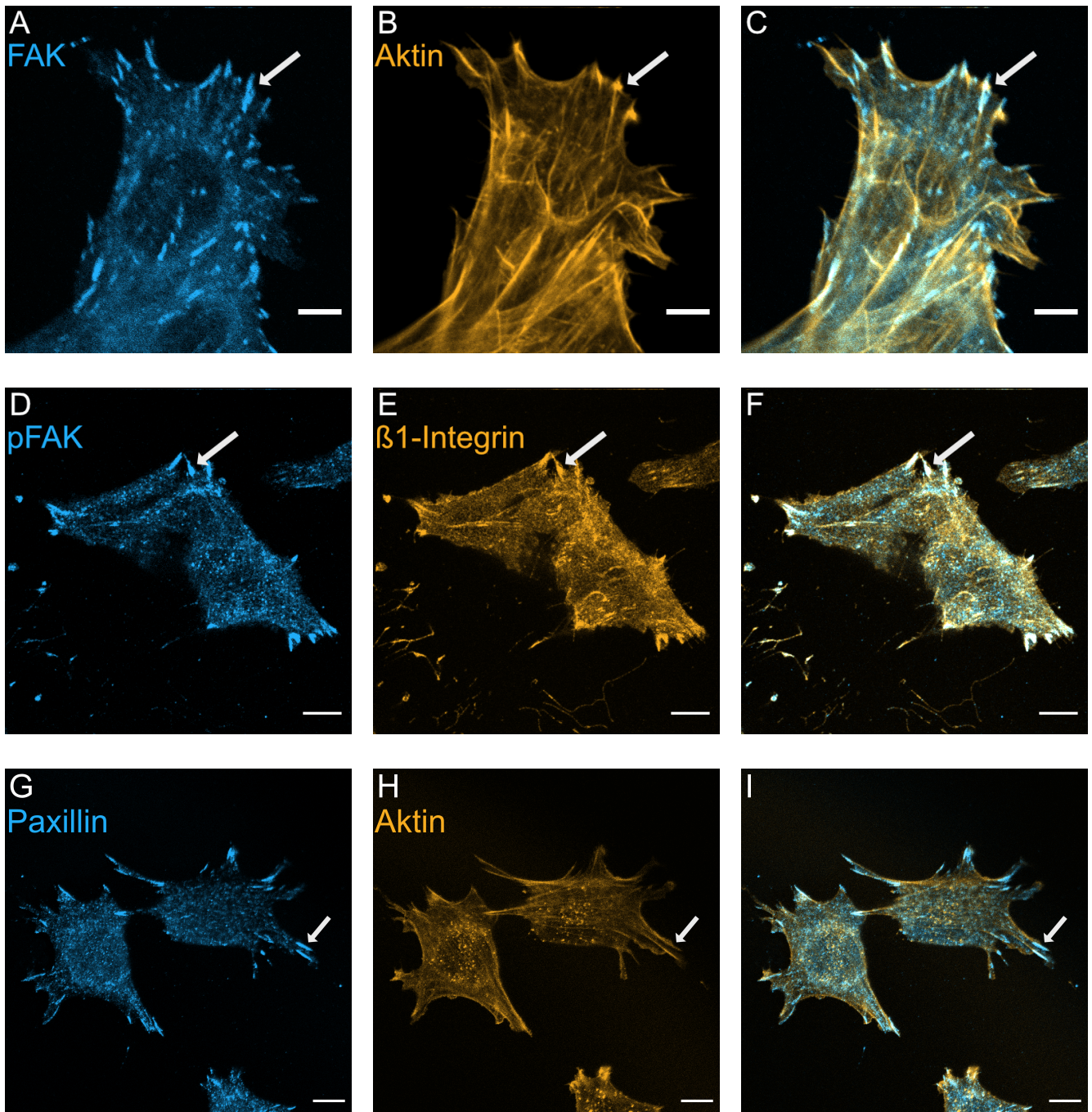


Abbildung 13: Unterschiedliche Antikörpermarkierungen bei MEF-Zellen. Die drei gezeigten Aufnahmen wurden mit den in der jeweiligen Farbe dargestellten ersten Antikörpern und anschließend mit einem sekundären Antikörper markiert. Die Kolokalisation von FAK und Aktin ist in A-C zu sehen. Die Reihenfolge der Rekrutierung, die in 1.2 beschrieben wird, kann hier gut nachvollzogen werden, da sich die FAK-Moleküle (blau) weiter außen, als die orange gefärbten Aktinstränge befinden. Dennoch sind viele Kolokalisationen zu beobachten. Bei den Bildern D-F ist die phosphorylierte Form der FAK (blau), zusammen mit der $\beta 1$ -Untereinheit der Integrine zu sehen. Hier sieht man ebenfalls eine deutliche Kolokalisation, wobei auch hier der Aufbau einer FA durch die weiter innen liegende pFAK bestätigt wird. Die hier in blau dargestellten Paxillin-Moleküle zeigen nur eine geringe Kolokalisation mit Aktin (orange), was ebenfalls den Erwartungen entspricht. Größensbalken = 10 μm

Die dritte und letzte hier gezeigte Markierung innerhalb einer MEF-Zelle zeigt die beiden Strukturproteine Paxillin und Aktin. Wie zuvor beschrieben und in Abbildung 1 gezeigt, wird Paxillin direkt durch die geclusterten Integrine rekrutiert und aktiviert dadurch die Bindung von Src und FAK. Daher ist, wie zu erwarten, die Markierung in Abbildung 13(G) hauptsächlich in den fokalen Adhäsionen zu sehen, hier ebenfalls in blau dargestellt. Aktin wurde wie schon in Abbildung 13(B) hier ebenfalls orangefarben dargestellt. Die Markierung sieht nahezu identisch aus und zeigt die typischen und deutlichen Stränge vom Zelläußeren ins Innere (Abb. 13H). Bei der Übereinanderlagerung der beiden Farbkanäle in Abbildung 13(I) ist allerdings nahezu keine Kolo-kalisation zu sehen. Der Grund hierfür ist die räumliche Trennung der beiden Strukturproteine, da Paxillin deutlich weiter außen als Aktin an den fokalen Adhäsionen rekrutiert wird. Dadurch sind diese fokalen Adhäsionen an der Außenseite blau markiert und besitzen einen ins orangefarben wechselnden Übergang in das Zellinnere.

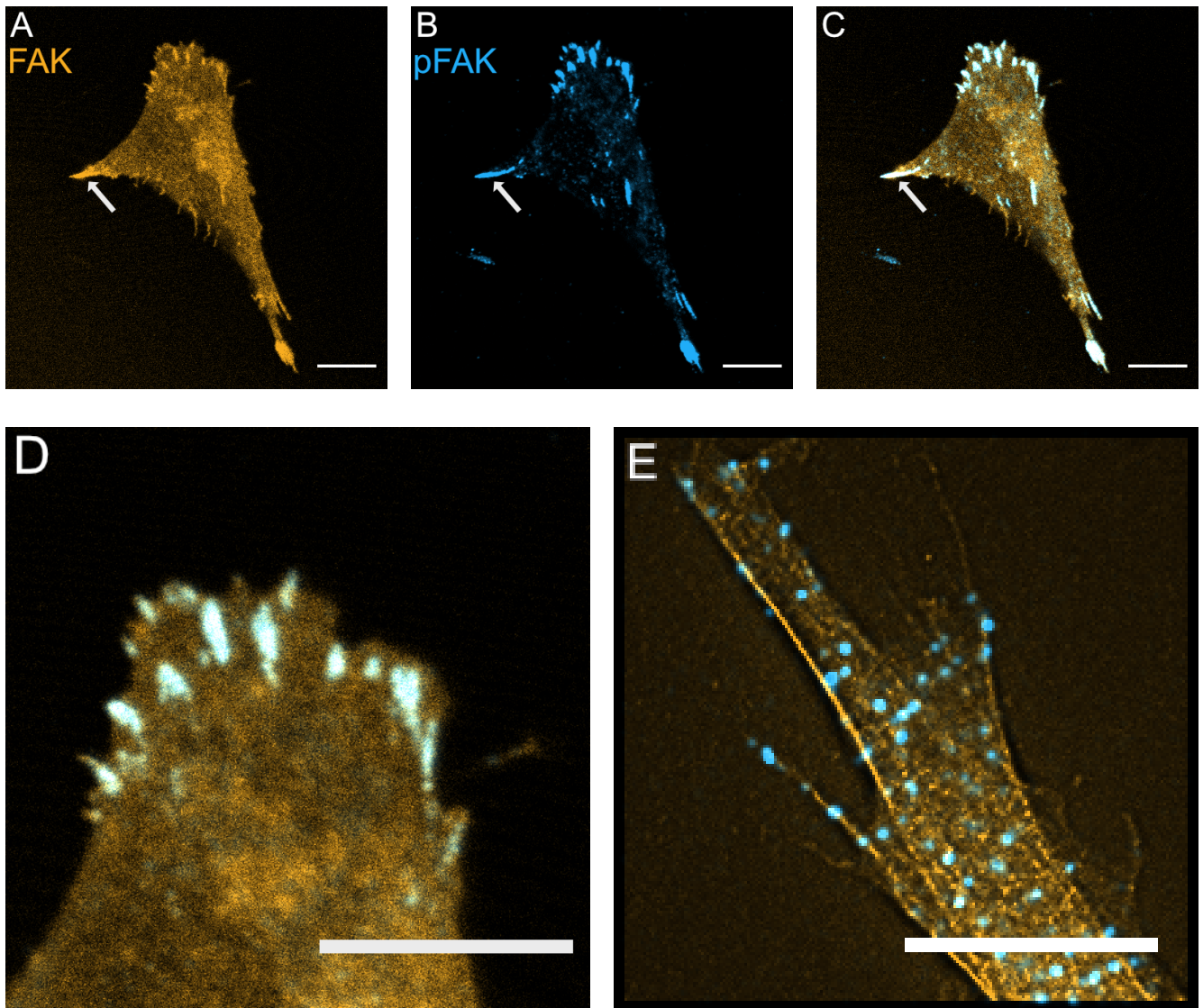


Abbildung 14: Antikörpermarkierungen von FAK und pFAK. Die gesamte MEF-Zelle wurde mit einem Antikörper für FAK (A, orange) und pFAK (B, blau) markiert. Die Überlagerung der beiden Bilder (C) zeigt die Kolokalisationen. (D) zeigt die obere Lamellipodie in Nahaufnahme. Zusätzlich wurden die Markierungen mit den *plugins* ThunderSTORM (für pFAK) und NanoJ (für Aktin) ausgewertet und dargestellt (E). ThunderSTORM kann punktuelle Strukturen sowie einzelne Positionsdaten gut erfassen, weswegen die Verwendung dieses *plugins* bei der pFAK-Verteilung sinnvoll ist. NanoJ hingegen wird für die Darstellung von Strukturen genutzt, wie sie bei der Bildung von Aktinsträngen zu finden sind.
Größenbalken = 10 μm

Da sich der Hauptanteil der Arbeit mit den Effekten der FAK-Inhibitoren auf die Clusterbildung in fokalen Adhäsionen beschäftigt, musste ein Antikörper verwendet werden, der spezifisch die aktive Form der FAK markiert. Weil diese phosphorylierte Form der FAK durch den Aufbau einer fokalen Adhäsion entsteht und demnach auch nur an den Lamellipodien der Zelle zu finden ist, fokussiert sich die Einzelmolekülmikroskopie in dieser Arbeit auf die phosphorylierte Form der FAK. Zur besseren Darstellung wurden die Antikörper für FAK und pFAK verglichen (Abb. 14). Es ist deutlich zu sehen, dass die fokalen Adhäsionen eine nahezu 100 %ige Kolokalisation der

beiden Antikörper aufweisen, während die nicht phosphorylierte Form der FAK, im Gegensatz zur pFAK, ebenfalls deutlich im Zytosol zu erkennen ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die am Tyrosin 397 phosphorylierte und somit aktive Form der FAK hauptsächlich für die Adhäsion und Migration zuständig ist. In Abbildung 14(D-E) ist eine Lamellipodie einer MEF-Zelle zu sehen, bei der die pFAK (blau) und FAK (orange) markiert wurden. Zu erwähnen ist, dass es sich bei den beiden Bildern nicht um die selbe Zelle handelt. In Abbildung 14(D) ist die konfokalmikroskopische Aufnahme einer solchen Lamellipodie zu sehen, während in Abbildung 14(E) eine solche Lamellipodie mittels TIRF (siehe Kapitel 4.3.1) aufgenommen wurde. Zusätzlich wurden die pFAK-Markierungen mittels ThunderSTORM analysiert und als *average shifted histogram* dargestellt. Das FIJI-plugin NanoJ erstellte die hier gezeigte Darstellung der Aktinfärbung mittels Phalloidin. Hier ist der Unterschied zwischen den beiden Mikroskopietechniken deutlich zu sehen, da die links zu sehenden ganzen fokalen Adhäsionen auf dem rechten Bild bereits in einzelne Cluster aufgelöst wurden. Bei den beiden Methoden ThunderSTORM und NanoJ, die in Abbildung 14(E) dargestellt werden, handelt es sich um Bildanalysetechniken, die durch mathematische Ansätze eine Superresolution ermöglichen. Anhand der Unterschiede in dieser Auflösung können die in Abbildung 14(D) gezeigten fokalen Adhäsionen als durchschnittlich $2.5\ \mu\text{m}$ groß beschrieben werden, wobei die in Abbildung 14(E) gezeigten pFAK-Cluster eine ungefähre Größe von 500 nm besitzen. Für die weitere Analyse der einzelnen Clusterstrukturen und deren Charakteristiken ist eine höhere Auflösung also zwingend erforderlich.

2.3 Einzelmolekülmikroskopie und die Validierung der Methode

Nachdem der Antikörper als spezifisch für die phosphorylierte Form der FAK validiert wurde, konnte er für die Aufnahme von fokalen Adhäsionen und insbesondere der pFAK-Cluster auf Einzelmolekülebene genutzt werden.

Alle hier gezeigten Messungen wurden von MEF oder SW620 in 2D Zellkultur mittels TIRF und PALM aufgenommen. Der genaue Ablauf ist in 4.3.2 beschrieben.

Bevor allerdings die eigentlichen Messungen durchgeführt werden konnten, musste die Auswertung der Daten zuvor validiert werden, um aussagekräftige Schlüsse aus den Rohdaten und Messungen zu erhalten.

2.3.1 Validierung der Clusteridentifikation und -analyse

Grundsätzlich ist die Validierung neuer Methoden eine wichtige Voraussetzung für spätere Arbeiten. Besonders für die Auswertung von Rohdaten ist diese Validierung entscheidend, da sonst sämtliche Aussagen, die aus Rohdaten gezogen werden, keiner Diskussion standhalten und auch nicht in die aktuelle Forschung eingeordnet werden können. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit dargelegten Auswertungen für die Identifikation der Cluster und deren Analyse mit eigenen, simulierten Daten überprüft.

Hierzu kamen die in 4.4 beschriebenen mathematischen Ansätze der Clusteridentifikation, DB-SCAN und HDB-SCAN, zum Einsatz. Die Überprüfung von automatisierten Auswertungen mittels simulierter Daten hat den großen Vorteil, dass die zugrunde liegenden Parameter im Gegensatz zu realen Messdaten bereits bekannt sind. Somit können die Ergebnisse direkt bewertet und auf ihre Korrektheit hin überprüft werden. Um die Identifikation der gemessenen Cluster und die darauf folgende Analyse zu validieren, wurden Lokalisationen einzelner Proteine in R simuliert (siehe Anhang 5.1).

Bei der Simulation realer Daten ist die Präzision und Ähnlichkeit der beiden Datensätze essenziell. Daher wurden sämtliche bekannten Parameter, die für die hier gezeigte Clusteranalyse relevant sind, den realen Daten nachempfunden. Im Detail hat dies zur Folge, dass sowohl die durchschnittliche Anzahl der Cluster pro ROI, als auch die Form und Größe der Cluster den realen Messdaten im Durchschnitt entsprechen. Die einzelnen Signale pro Cluster wurden allerdings geschätzt, da die Analysemethode nicht für die eigene Validierung genutzt werden kann und eine vorherige Messung der Daten daher irrelevant wäre. Außerdem ist auch schon bei einer händischen Auswertung deutlich zu erkennen, dass die Signaldichte pro Cluster stark variieren kann. Daher wurde die Anzahl der Cluster zwischen 2-10 pro ROI gesetzt, die Signaldichte innerhalb eines Clusters liegt zwischen 10-300 und der Hintergrund ist mit 250-600 Signalen ebenfalls äußerst variabel gehalten. Die entstandenen Daten wurden ebenfalls optisch mit den

realen Rohdaten verglichen, um eine bestmögliche Übereinstimmung zu erhalten. Insgesamt wurden 100 ROI simuliert und mit allen gezeigten Auswertemethoden analysiert (Abb. 15).

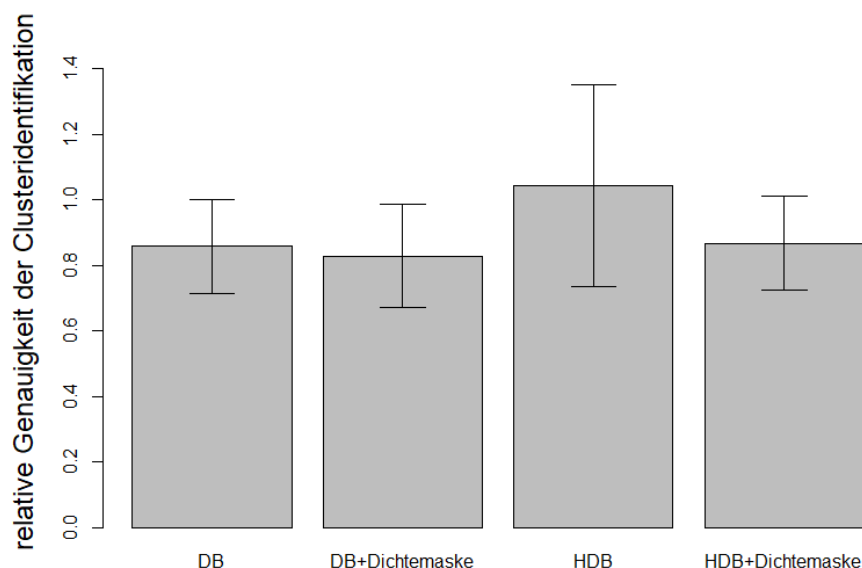


Abbildung 15: Der Quotient aus den durch die verschiedenen Methoden ermittelten Cluster durch die zugrunde liegenden Parameter (*ground truth*). Durch diese Darstellung der jeweiligen Clusteridentifikationen kann die Genauigkeit der einzelnen Methoden gegenüber der *ground truth* ermittelt werden. Es wurden sowohl die Anzahl der Cluster (2-10), die Signaldichte pro Cluster (10-300) als auch die Hintergrundsignale in jeder ROI (250-600) variiert, um eine möglichst variable und damit reale Abbildung der Messergebnisse zu erhalten.

Allerdings zeigen sich kaum Unterschiede in den verschiedenen Methoden der Clusteridentifikation. Alleinige Ausnahme scheint hier der HDB-SCAN mit vorangehender Eliminierung des Hintergrundes durch eine Dichtemaske zu sein. Dieser Unterschied ist auf die sehr hohe Variabilität in der Clusterfindung des HDB-SCANs zurückzuführen, da er, im Unterschied zum DB-SCAN, keine Parameter bezüglich der Größe der zu findenden Cluster benötigt, sondern diesen selbst für jeden Cluster neu definiert.

Jedoch wurden bei der stichprobenartigen, manuellen Auswertung andere Fehler der einzelnen Clusteridentifikationen gefunden, die in Abbildung 15 nicht einzusehen sind.

Eine Gemeinsamkeit aller gezeigten Auswertungen ist die Unfähigkeit, übereinander liegende Cluster zu separieren. Obwohl es Methoden gibt, die durch multiple Dichteverteilungen solche doppelten Cluster unterscheiden können, wurde in dieser Arbeit auf solche komplizierteren Methoden verzichtet, da es den realen Daten in keiner Weise entspricht. In einer Zelle wäre nämlich ein solcher doppelter Cluster nicht möglich, da es keine übereinander liegenden, doppelten fokalen Adhäsionen oder Proteincluster gibt. Allerdings führen solche Überlagerungen an Clustern dazu, dass keine der gezeigten Auswertungen in Abbildung 15 eine 100 %ige Genauigkeit der Identifikation erreicht, da bei der Simulation der Daten nicht verhindert wurde, dass doppelte

Cluster entstehen. Durch die hohe Statistik hat dieser Effekt nur einen sehr geringen Einfluss und wurde daher nicht weiter verfolgt.

In Abbildung 16 ist eine simulierte ROI als Punktdiagramm (A) zu sehen sowie die angelegte binäre Dichtemaske (B). In Abbildung 16(C-D) ist die Clusteridentifikation mittels DB-SCAN zu sehen, sowohl mit als auch ohne der angewendeten Dichtemaske zur Eliminierung des Hintergrundes. Darunter sind die Ergebnisse des HDB-SCANs, ebenfalls mit bzw. ohne Maske (E-F) dargestellt.

An diesem Beispiel ist die Funktionsweise des DB- und HDB-SCANs gut zu erkennen. Obwohl in Abbildung 15 keine Differenz der Methoden zu verzeichnen ist, konnten dennoch im Großteil in unseren simulierten Rohdaten systematische Fehler in der DB-SCAN Methode entdeckt werden. Der Hauptunterschied der Methoden zeichnet sich dadurch aus, dass der HDB-SCAN in der Lage zu sein scheint, eng benachbarte Cluster zu unterscheiden, während DB-SCAN diese oft als einen Cluster identifiziert (Abb. 16, schwarze Pfeile). Trotz der Zusammenfassung einiger Cluster innerhalb der Dichtemaske, schafft es der HDB-SCAN dennoch in den meisten Fällen, diese einzelnen Cluster zu unterscheiden.

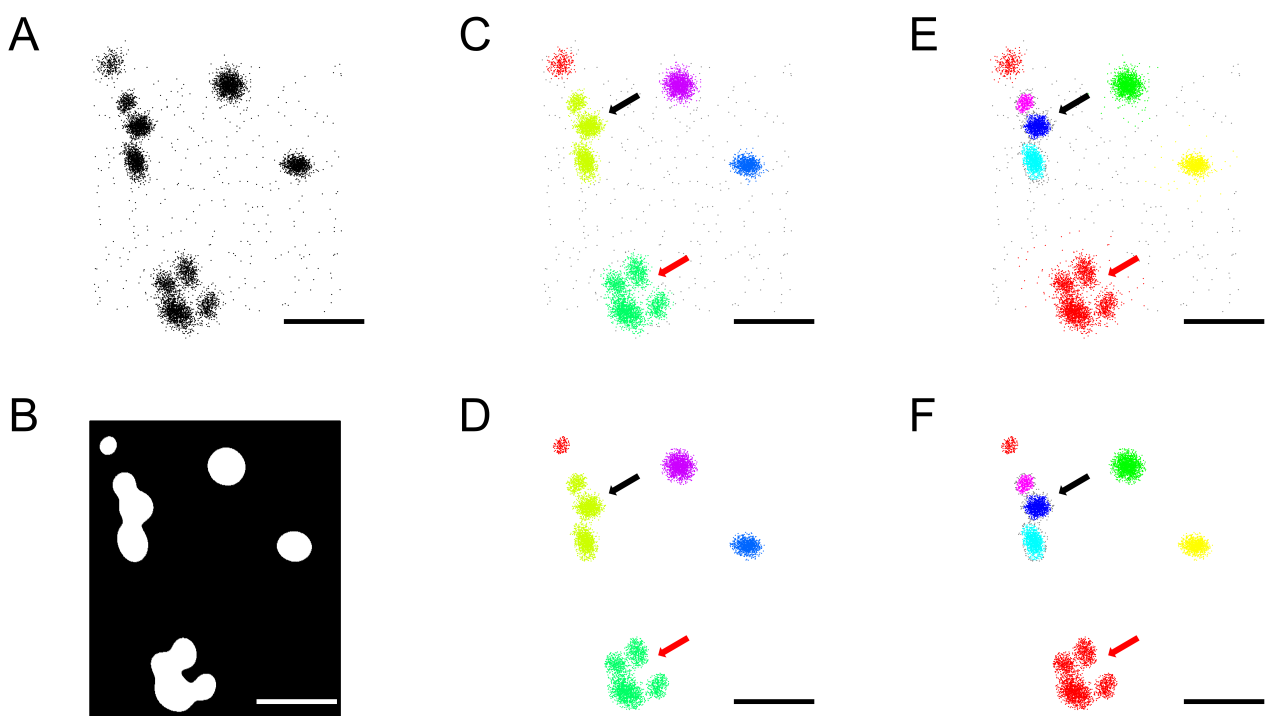


Abbildung 16: Die Rohdaten wurden in einem Punktdiagramm (A) dargestellt. Die aus der Dichte der Positionsdaten resultierende Maske (B) wurden verwendet, um die Rohdaten aufgrund der Dichteverteilung des Hintergrundes zu filtern. Sowohl die ungefilterten Rohdaten als auch die bereinigten Cluster wurden mittels DB-SCAN (C-D) oder HDB-SCAN (E-F) ausgewertet. An dieser beispielhaften ROI ist der Vorteil des HDB-SCANs gut zu sehen, da dieser im Vergleich zum DB-SCAN, eng benachbarte Ansammlungen von Clustern unterscheiden kann (schwarze Pfeile). Mit den roten Pfeilen wurden Ansammlungen von Clustern markiert, die in die Randbedingungen beider Auswertemethoden fallen und somit nicht getrennt werden können.
Größenbalken = 1 μm

Es gibt jedoch Randbedingungen, die keine der Auswertemethoden auflösen vermag. Hierzu zählen zu eng benachbarte und, wie bereits beschrieben, übereinander liegende Cluster (Abb. 16, rote Pfeile). Um den Einfluss solcher Randbedingungen zu minimieren, wurde sowohl bei der Simulation der Daten als auch bei den späteren Messungen, Wert auf eine hohe Statistik gelegt. Insgesamt wurden in dieser beispielhaften ROI 10 Cluster simuliert, wobei lediglich fünf durch die DB-SCAN und sieben durch den HDB-SCAN identifiziert wurden.

Um die Auswertemethoden jedoch ganzheitlich überprüfen zu können, wurde bei der Simulation der Rohdaten darauf geachtet, dass es auch Cluster gibt, die in die Randbedingungen der Analyse fallen. Hierzu zählen zu kleine Cluster und solche, mit zu geringer Dichte. Diese Cluster sollen von der automatisierten Auswertung nicht erfasst werden.

Daher ist in einem weiteren Beispiel der konkrete Nutzen der Dichtemaske dargestellt. In der Abbildung 17 sieht man die unterschiedliche Anzahl und Größe der identifizierten Cluster, sowohl vor bzw. nach der Eliminierung des Hintergrundes durch die Dichtemaske. Der mit schwarzen Pfeilen markierte Cluster ist ein Beispiel für eine solche Randbedingung und wird somit nicht als auszuwertender Cluster identifiziert. Die Eliminierung des Hintergrundes, basierend auf der Dichteverteilung (Abb. 17B), schließt ebenfalls solche Kandidaten aus.

Die andere Randbedingung, also die Größe der Cluster, wird durch die Mindestanzahl an Signalen innerhalb eines Clusters festgelegt (siehe Kapitel 4.4).

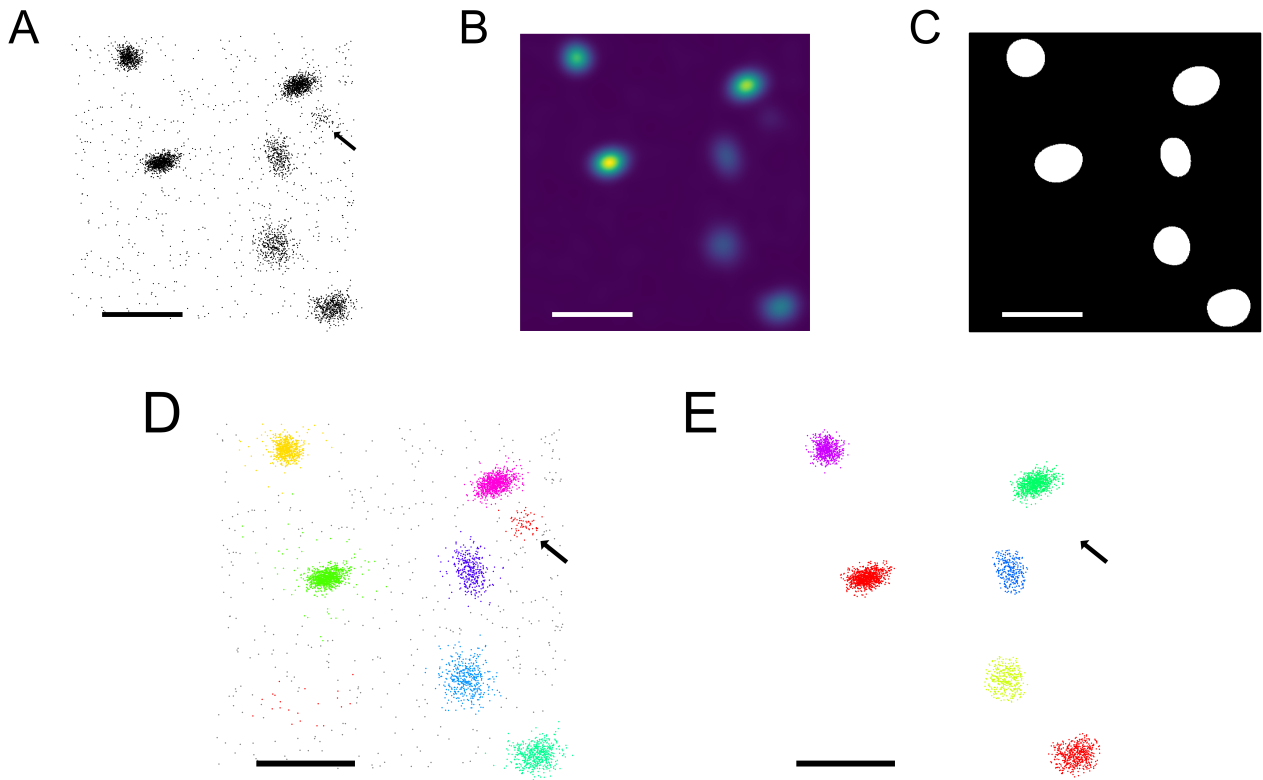


Abbildung 17: Die Rohdaten wurden in einem Punktediagramm (A) und als Heatmap (B) dargestellt. Die dadurch entstandene binäre Maske (C) kann dann auf das Punktediagramm gelegt werden, um Cluster mit zu geringer Dichte heraus zu filtern (schwarze Pfeile). Im direkten Vergleich von (D) zu (E) ist der Effekt der Dichtemaske auf die Auswertung der Rohdaten mittels HDB-SCAN zu sehen. Hier wurde ein Cluster mit zu geringer Dichte eliminiert, obwohl er von dem sehr variablen HDB-SCAN erkannt worden wäre.
Größenbalken = 1 μm

Aufgrund der relativ gleichwertigen Genauigkeit der einzelnen Methoden und die in den Rohdaten ermittelten falschen Zuordnungen des DB-SCANs, wurde sich für die gesamte nachfolgende Clusteranalyse für den HDB-SCAN mit vorangehender Eliminierung des Hintergrundes mittels Dichtemaske entschieden.

Eine wichtige beschriebene Randbedingungen des HDB-SCANs ist jedoch, dass diese Methode keine Cluster finden kann, wenn es nur einen pro ROI gibt [65]. Bei den hier gezeigten Messungen wurde daher auf eine Mindestanzahl von zwei Clustern pro ROI geachtet.

2.4 Einfluss der Inhibitoren auf pFAK-Cluster auf Einzelmolekülebene

Pro Behandlung wurden 400-500 Cluster in 30 Zellen analysiert und jeweils eine Kontrolle mitgeführt. Die Kontrollen wurden anschließend zusammengefasst, sodass insgesamt ca. 4800 Cluster in 210 Zellen für die Kontrolle analysiert wurden. Alle gezeigten Messungen sind zu unterschiedlichen Zeiten und somit auch von verschiedenen Zellpassagen angefertigt worden, um die Variabilität der Zellkultur zu berücksichtigen. Zusätzlich wurden zeitlich unabhängig Wiederholungen aller Messungen angefertigt, um technische Fehler auszuschließen. Diese Angaben beziehen sich jeweils auf beide untersuchten Zelltypen.

Im Folgenden sind diese Messungen zusammengefasst, sortiert nach Zelltyp und Konzentration, dargestellt. Der Einfluss der FAK-Inhibitoren Y15 und Y11 auf die Cluster in fokalen Adhäsionen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 min, 1 h, 24 h) gemessen, um eine schnelle und langsame Reaktion sowie Zellantwort zu beobachten.

2.4.1 Einfluss von Y15 auf pFAK-Cluster in MEF-Zellen

Schon bei geringen Konzentrationen, im Vergleich zu der Lebendzellfärbung und Literaturwerten, zeigt der Inhibitor Y15 einen deutlichen Effekt auf die pFAK-Cluster in MEF-Zellen (Abb. 18).

Nach bereits 15 Minuten Inkubation mit 1 μM Y15 ist ein deutlicher Anstieg sowohl in der Größe als auch in der Anzahl der Signale innerhalb der Cluster zu beobachten. Da der Anstieg der Signale pro Cluster allerdings höher als die Zunahme der Clustergröße ist, zeigt sich eine Abnahme der Signaldichte innerhalb der Cluster. Der Anstieg an Clustergröße ist auch bei der 5-fachen Konzentration zu messen, jedoch ist keine Zunahme an Signalen pro Cluster zu beobachten. Für die Dichte bedeutet dies einen deutlich stärkeren Rückgang bei 5 μM , im Vergleich zur Kontrolle und auch zu der Behandlung mit 1 μM .

Nach einstündiger Inkubation mit 1 μM des Inhibitors ist nahezu kein Unterschied in der Größe der Cluster zur Kontrolle zu sehen. Dennoch ist nach einer Stunde eine Verringerung der Signale zu messen, die sich nach 24-stündiger Inkubation erholen. Daraus resultiert eine zunächst niedrigere Dichte an Signalen in der Clustern, wobei sich dieser Effekt nach 24 Stunden aufhebt.

Bei der Inkubation mit 5 μM Y15 ist nach einer bzw. 24 Stunden ein Rückgang der Signale pro Cluster, bei gleichzeitiger Verringerung der Clustergröße, zu sehen. Dieser Effekt relativiert sich auch nur minimal nach 24 Stunden, was eine generelle Abnahme der Dichte zur Folge hat.

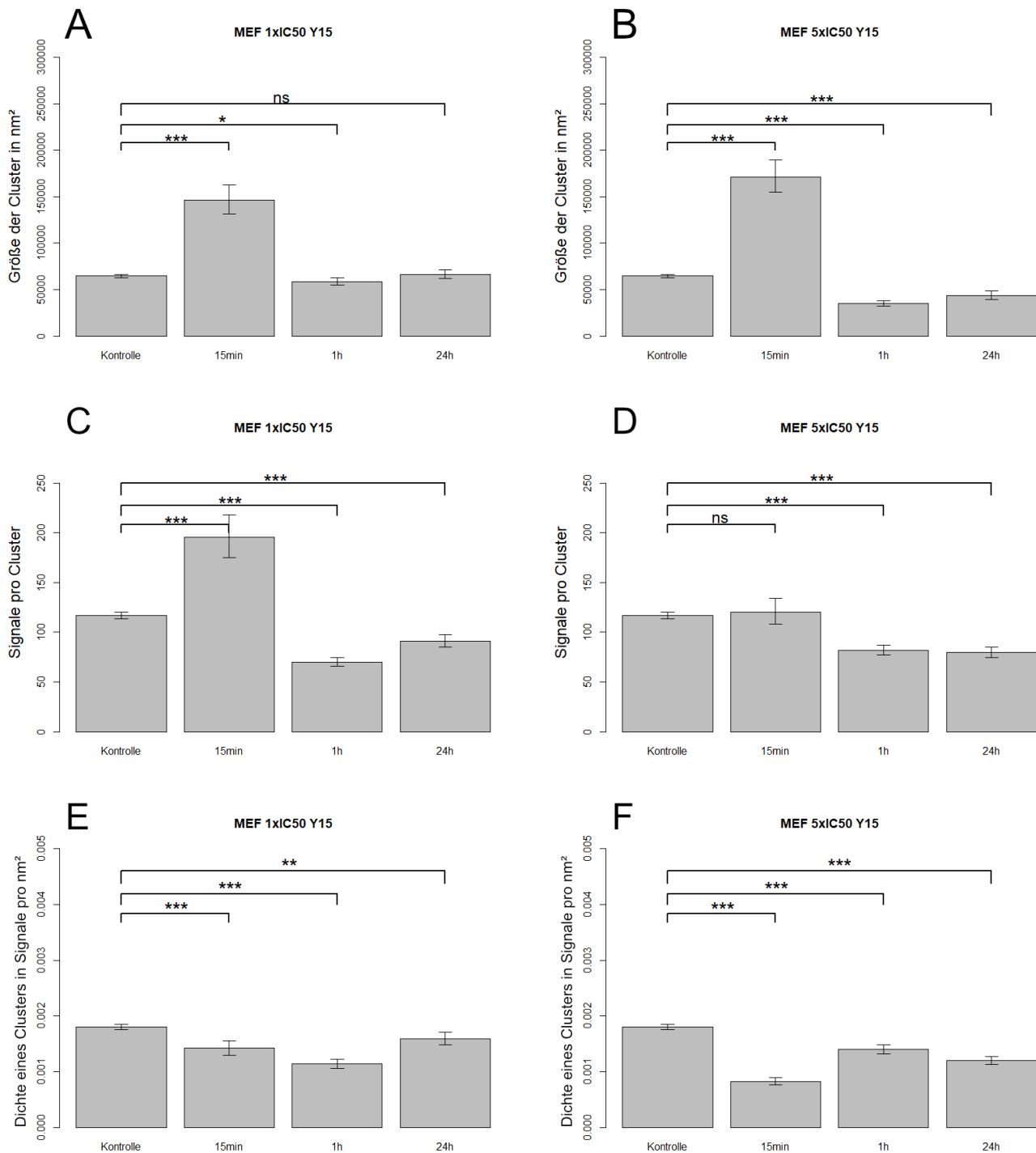


Abbildung 18: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 1 μ M (A, C, E) und 5 μ M (B, D, F) des Inhibitors Y15. Die Vergrößerung der Cluster ist sowohl bei einfacher als auch bei 5-facher IC_{50} Konzentration zu beobachten. Allerdings ist die Zunahme der Signale pro Cluster nur bei 1 μ M Y15 zu beobachten. Der generelle Rückgang an Signalen bei ein- bzw. 24-stündiger Inkubation ist bei beiden Konzentrationen ähnlich. Hieraus resultiert ein Rückgang der Signaldichte innerhalb der Cluster bei allen Zeitwerten, wobei sich der initiale Rückgang bei 5 μ M nach 15 Minuten bei einer längeren Inkubation ausgleicht.

Interessanterweise gibt es deutliche Unterschiede bei der Inkubation von MEF-Zellen mit höheren Konzentrationen des Inhibitors Y15. In Abbildung 19 sind pFAK-Cluster dargestellt, die mit

10 μM Y15 inkubiert wurden.

Die initial angenommene Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Vergrößerung der Cluster bestätigt sich nicht bei der weiteren Erhöhung der Konzentration. Die Größe ist mit der Behandlung mit 1 μM des Inhibitors vergleichbar und ist somit kleiner, als nach der Behandlung mit 5 μM .

Bei der Anzahl der detektierten Signale ist der Unterschied zur geringeren Konzentration nicht messbar. Sowohl bei der Inkubation von MEF-Zellen mit 5 μM als auch mit 10 μM des FAK-Inhibitors Y15 zeigt sich nach 15 Minuten kein Effekt auf die Anzahl der Signale und somit auch auf die FAK-Moleküle.

Die hieraus resultierende Dichte im Verlauf der drei Zeitwerte 15 Minuten, eine Stunde und 24 Stunden, zeigt einen initialen Zerfall der Cluster, was sich jedoch mit der Zeit wieder normalisiert.

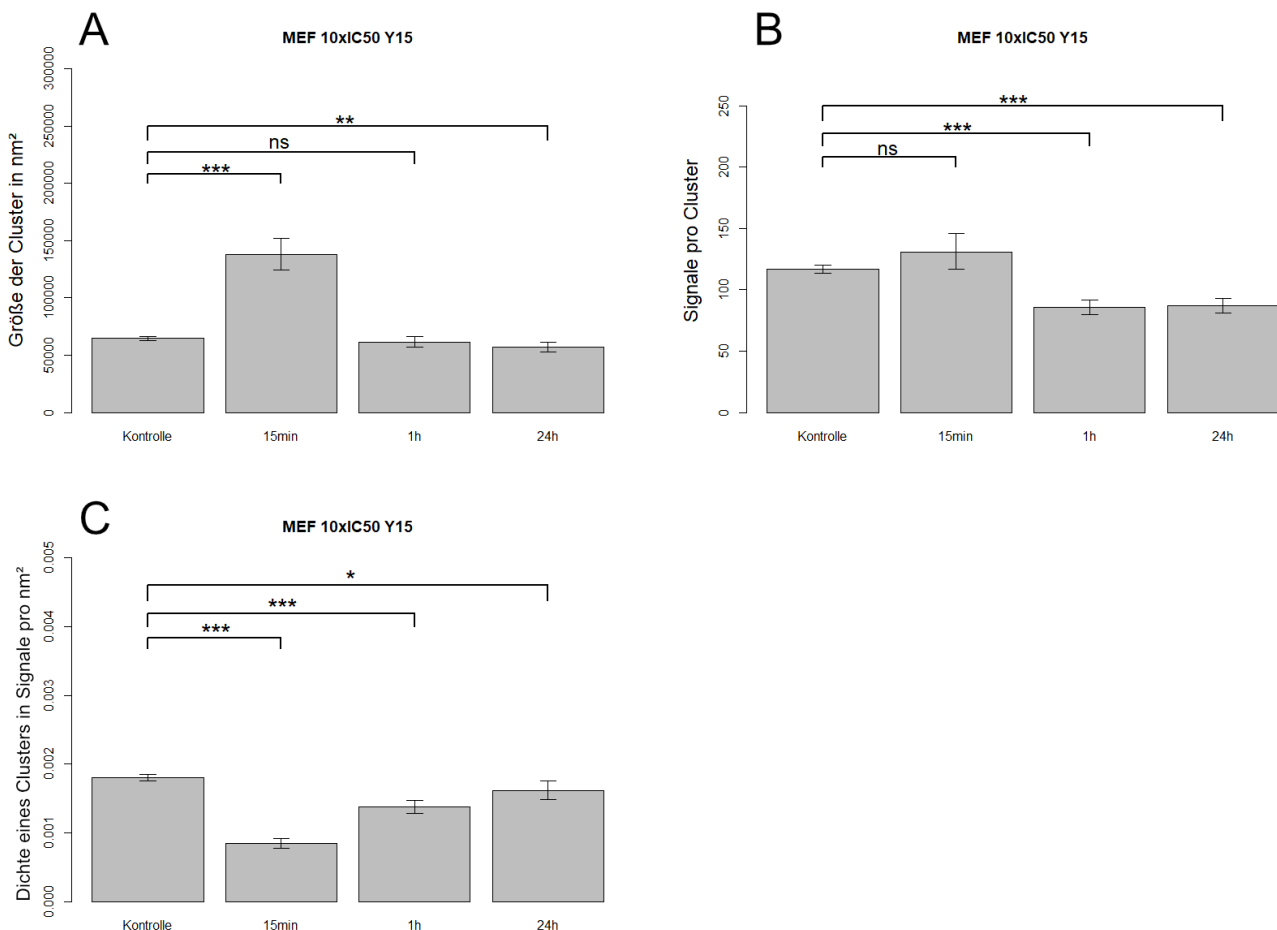


Abbildung 19: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 10 μM des Inhibitors Y15. Die Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten ist im Vergleich mit niedriger Konzentrationen geringer und verhält sich ähnlich der Inkubation mit 1 μM des Inhibitors. Die Anzahl der detektierten Signale hat sich im Vergleich zu der Behandlung mit 5 μM nicht verändert. Die späteren Effekte, nach einer bzw. 24 Stunden, sind ebenfalls der Behandlung mit 5 μM sehr ähnlich. Die hieraus resultierende Clusterdichte zeigt einen initialen Zerfall der Cluster, was sich über die Zeit von 24 Stunden aber wieder normalisiert.

2.4.2 Einfluss von Y11 auf MEF-Zellen

Wie bereits in den Lebendzellfärbungen unter 2.1 beschrieben, wurden die hier verwendeten MEF-Zellen ebenfalls mit dem FAK-Inhibitor Y11 behandelt.

Im Gegensatz zu der Wirkung von Y15, ist bei der einfachen IC_{50} -Konzentration von Y11 (50 nM) kein Anstieg an Signalen in den Clustern nach 15 Minuten Inkubation zu beobachten. Dennoch ist die Zunahme der Clustergröße sogar höher. Hieraus resultiert ein sehr starker Rückgang in der Signaldichte innerhalb der Cluster.

Bei einer einstündigen Inkubation ist allerdings ein genau gegenteiliger Effekt zu erkennen. Hier gibt es ebenfalls keine Änderung bezüglich der Anzahl an Signalen und somit FAK-Molekülen, jedoch ist statt einer starken Vergrößerung eine Senkung der Clustergröße zu beobachten, was in einer deutlichen Zunahme der Dichte resultiert.

Bei einer 24-stündigen Inkubation mit 50 nM des Inhibitors Y11 ist kein messbarer Effekt bezüglich der Größe der Cluster zu erkennen. Jedoch gibt es hier, anders als bei den eher kürzeren Inkubationszeiten, einen Rückgang der Signale innerhalb der Cluster, was letztlich ebenfalls in einer Verminderung der Dichte endet.

Die schnelle Zellantwort von MEF-Zellen bei der Inkubation mit Y11 ändert sich bei höheren Konzentrationen (250 nM) nicht sehr stark. Die Größe der Cluster nimmt weiter zu, die Signale bleiben ebenfalls auf dem Niveau der Kontrolle, sodass eine noch geringere Dichte innerhalb der Cluster zu verzeichnen ist.

Allerdings ist bei der 5-fachen Konzentration des IC_{50} -Wertes (250 nM) bereits nach einer Stunde ein Rückgang der FAK-Anzahl zu beobachten. Hierdurch wird, anders als bei der einstündigen Inkubation, die Dichte der Cluster ebenfalls deutlich herabgesetzt, anstatt sie zu erhöhen.

Nach 24 Stunden erholt sich dieser Effekt ebenfalls, wie bei der einfachen Konzentration.

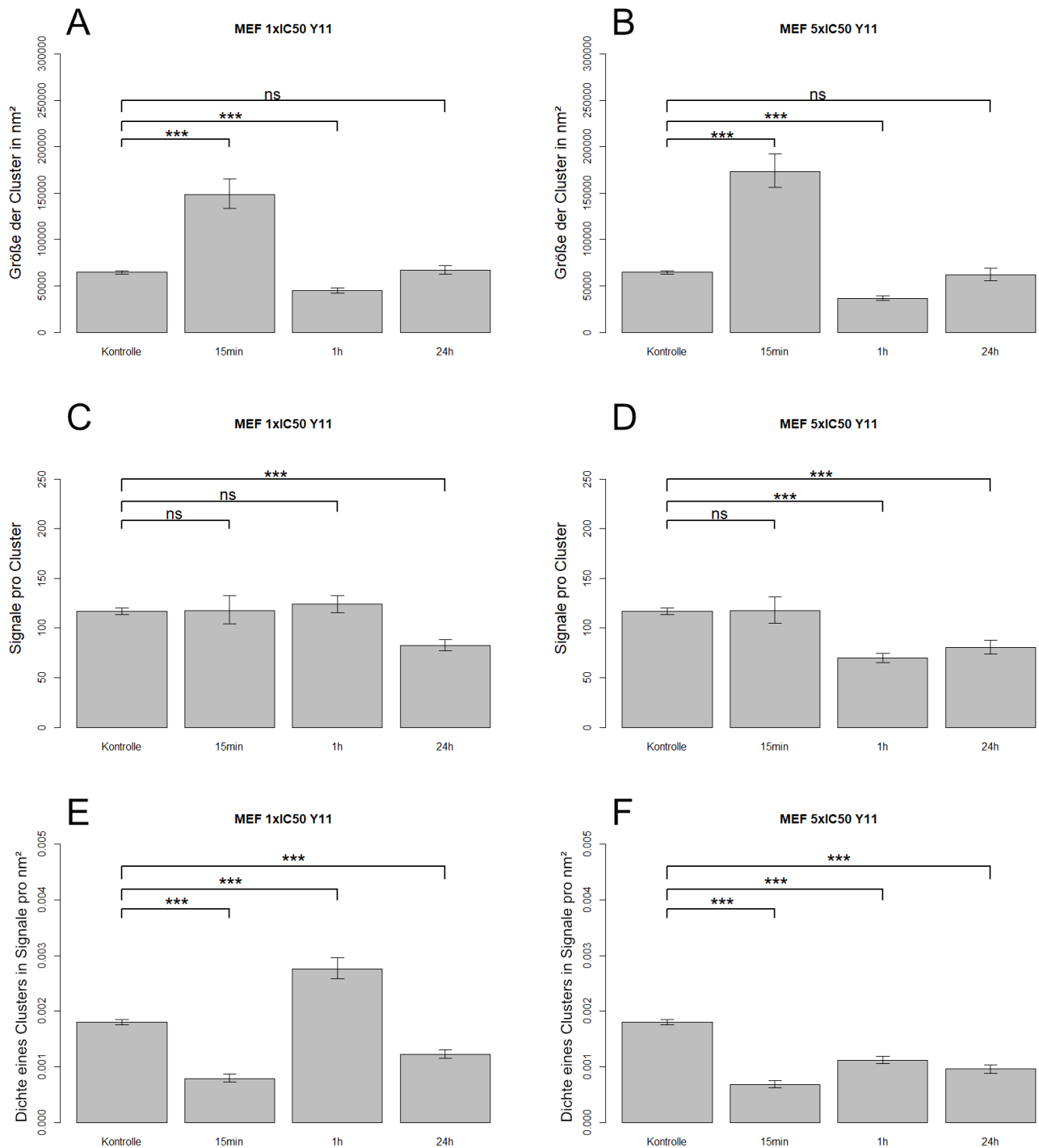


Abbildung 20: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 50 nM (A, C, E) und 250 nM (B, D, F) des Inhibitors Y11. Die initiale, schnelle Zellantwort bezüglich der Größe der Cluster ist bei der einfachen bzw. 5-fachen Konzentration (50 nM und 250 nM) ähnlich, wobei der Effekt bei der höheren Konzentration stärker ist. Die absolute Anzahl an FAK-Molekülen innerhalb der Cluster verändert sich erst nach längerer Inkubationszeit, wobei auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit vorlag (24 h bei 50 nM; 1 h bei 250 nM). Dieser Unterschied resultiert in einer deutlich veränderten Dichte von FAK-Molekülen in den Clustern nach einer einstündigen Inkubation. Nach 24 Stunden erholt sich der Effekt allerdings wieder.

Bei der Behandlung von MEF-Zellen mit der 10-fachen Konzentration des Inhibitors Y11 sind in der initialen Zellantwort keine großen Unterschieden zu beobachten. Die Größe der Cluster ist vorerst stark erhöht. Nach einer Stunde schlägt dieser Effekt allerdings in das Gegenteil um und resultiert in kleineren Clustern. Schlussendlich scheinen sich die Zellen auf der Ebene der fokalen Adhäsionen und den darin befindlichen FAK-Cluster wieder zu erholen, sodass es nach 24 Stunden keine messbaren Effekte auf die Clustergröße gibt.

Die Anzahl der detektierten Signale nimmt bei der Behandlung mit 2.5 μ M Y11 nach einer und nach 24 Stunden deutlich ab, wobei sich nach 15 Minuten Inkubationszeit noch kein messbarer Effekt zeigt.

Dadurch entsteht ein initialer Rückgang der Signaldichte innerhalb der Cluster, welche sich zunächst wieder erholt, nach 24 Stunden allerdings erneut abfällt. Dieser Effekt wird durch die gleichzeitige Erholung der Clustergröße bei stetiger Verringerung der Signale bedingt.

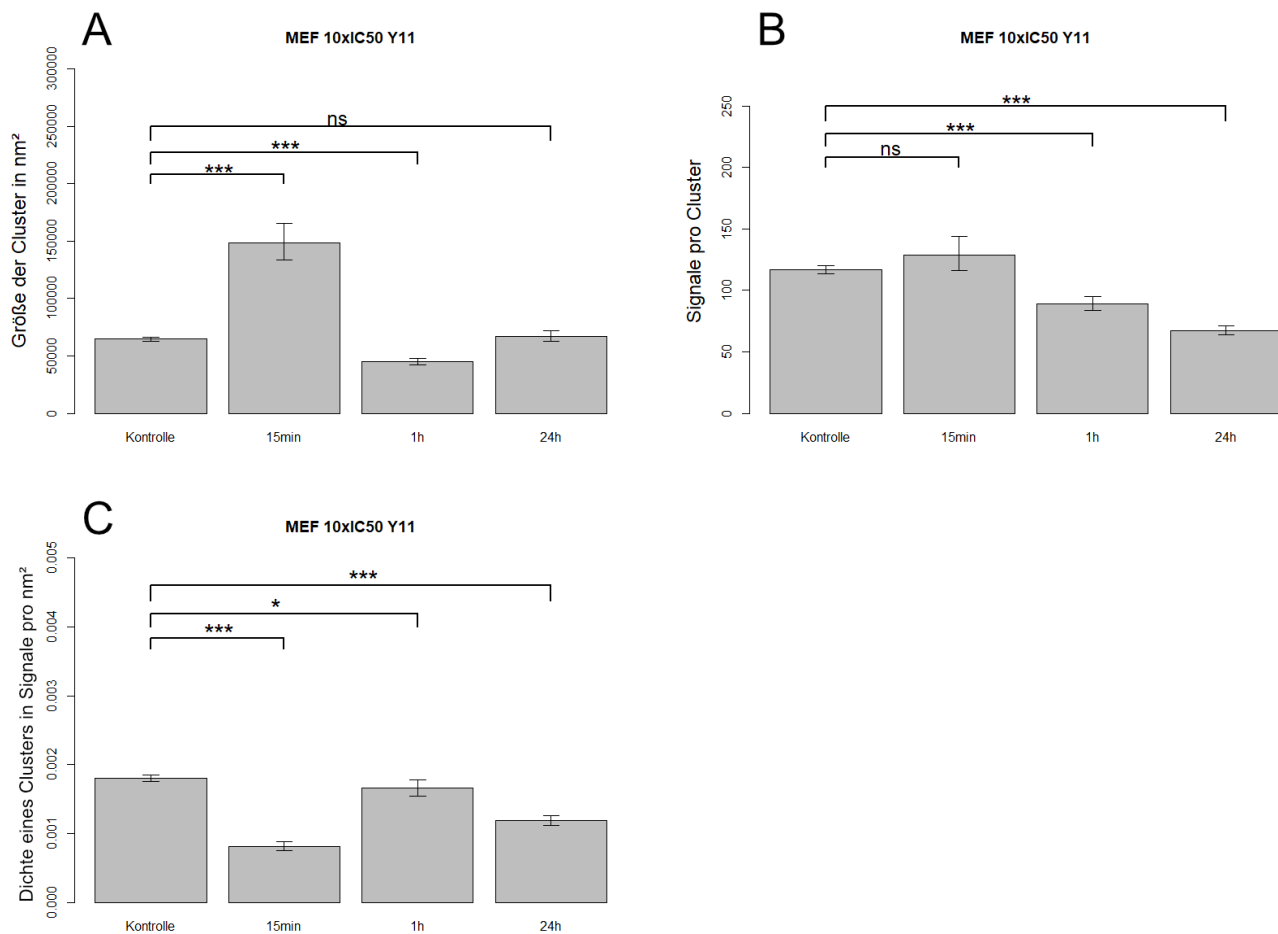


Abbildung 21: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 500 nM des Inhibitors Y11. Die Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten ist im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen ähnlich und verhält sich fast identisch mit der Inkubation mit 1 μ M des Inhibitors. Die Anzahl der detektierten Signale hat sich im Vergleich zu der Behandlung mit 5 μ M nur leicht verändert. Die späteren Effekte, nach einer bzw. 24 Stunden, sind ebenfalls der Behandlung mit 5 μ M sehr ähnlich. Die hieraus resultierende Clusterdichte zeigt einen initialen Zerfall der Cluster, was sich nach eine Stunde wieder normalisiert. Dieser Effekt tritt allerdings erneut, wenn auch schwächer, nach der 24-stündigen Inkubation auf.

2.4.3 Einfluss von Y15 auf SW620-Zellen

Bei den hier untersuchten menschlichen Krebszellen sind ebenfalls Effekte bereits nach 15-minütiger Inkubation mit dem Inhibitor Y15 zu beobachten.

Die Größe der Cluster nimmt, ähnlich wie bei MEF-Zellen, bereits nach 15 Minuten stark zu und normalisiert sich nach längeren Inkubationszeiten wieder. Der minimale Rückgang an Clustergröße nach einer einstündigen Inkubation ist ebenfalls ähnlich der MEF-Zellen.

Es gibt jedoch große Unterschiede bei der Anzahl an FAK-Molekülen in den Clustern. Hier ist sowohl bei der einfachen als auch bei der 5-fachen Konzentration keine Erhöhung zu verzeichnen. Dadurch entsteht eine sehr geringe Dichte innerhalb der Cluster.

Allerdings ist nach einer Stunde ein Rückgang der Signale sowohl bei 1 μM als auch bei 5 μM von Y15 zu beobachten, wobei auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit vorliegt. Dieser Effekt normalisiert sich lediglich bei geringen Konzentrationen, bei 5 μM bleibt der Effekt auch nach 24 Stunden bestehen.

Die aus der Größe der Cluster und Anzahl an Signalen pro Cluster resultierende Dichte zeigt hier über die Zeit eine konzentrationsabhängige Wirkung, die sich bei längeren Inkubationszeiten wieder negiert. Bei einer Inkubation mit 1 μM ist der Effekt bezüglich der Dichte bereits nach einer Stunde ähnlich der Kontrolle und bei 24 Stunden nicht mehr messbar. Bei der 5-fachen Konzentration bleibt der Effekt länger erhalten und erholt sich deutlich langsamer.

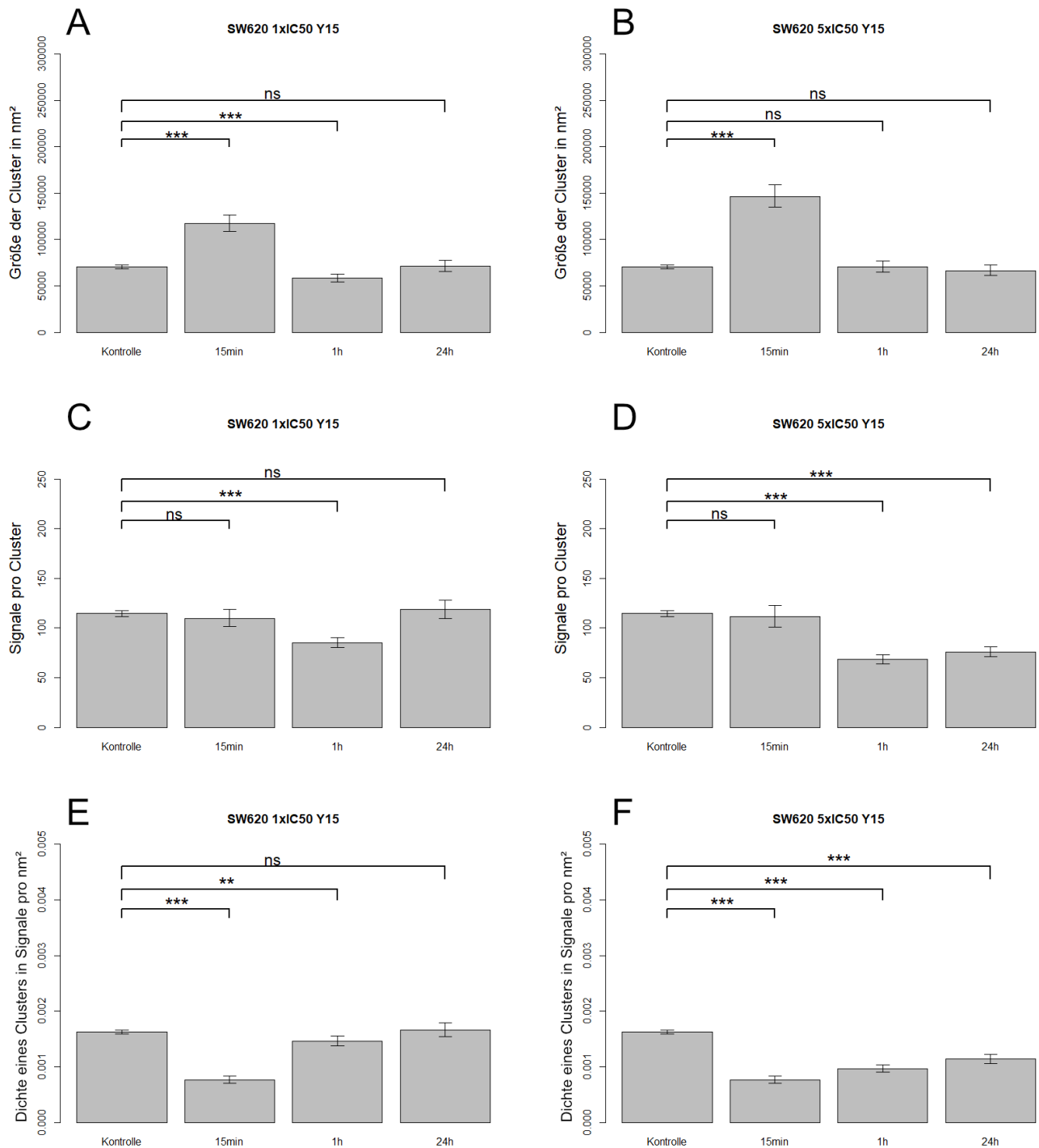


Abbildung 22: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 1 μ M (A, C, E) und 250 nM (B, D, F) des Inhibitors Y15. Die Zunahme der Clustergröße ist konzentrationsabhängig und zeigt sich bereits nach 15 Minuten. Diese schnelle Zellantwort ist allerdings bereits nach einer einstündigen Inkubation mit dem Inhibitor nicht mehr zu beobachten. Die Anzahl der Signale verändert sich erst nach längerer Inkubation, wobei auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten ist. Sowohl bei 1 μ M als auch bei 5 μ M gibt es eine Verringerung der FAK-Anzahl, wobei sich dieser Effekt bei geringeren Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden negiert, bei höheren Konzentrationen allerdings bestehen bleibt bzw. nur eine leichte Erholung zu messen ist. Die hieraus resultierenden Dichten innerhalb der Cluster lassen auf eine Erholung nach längerer Zeit schließen, die durch höherer Konzentrationen verlangsamt bzw. verhindert wird.

Obwohl die initiale Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten keinen Unterschied zu geringeren Konzentrationen zeigt, verringert sich bei der Behandlung von SW620-Zellen mit dem Inhibitor Y15 nach einer Stunde die Größe deutlich. Erst nach 24 Stunden normalisiert sich dieser Effekt.

Anders als bei den geringeren Konzentration von 1 μM und 5 μM kommt es bei der Inkubation mit 10 μM zu keiner Änderung in der Anzahl an FAK-Molekülen innerhalb der Cluster.

Dadurch entsteht eine initiale Verringerung der Dichte, die jedoch nach einer Stunde ins Gegenteil umgeschlagen ist und eine sehr deutliche Erhöhung anzeigt. Nach 24 Stunden haben sich die Cluster im Vergleich zu den vorigen Effekten wieder etwas erholt, sodass nur noch eine geringe Änderung zu beobachten ist.

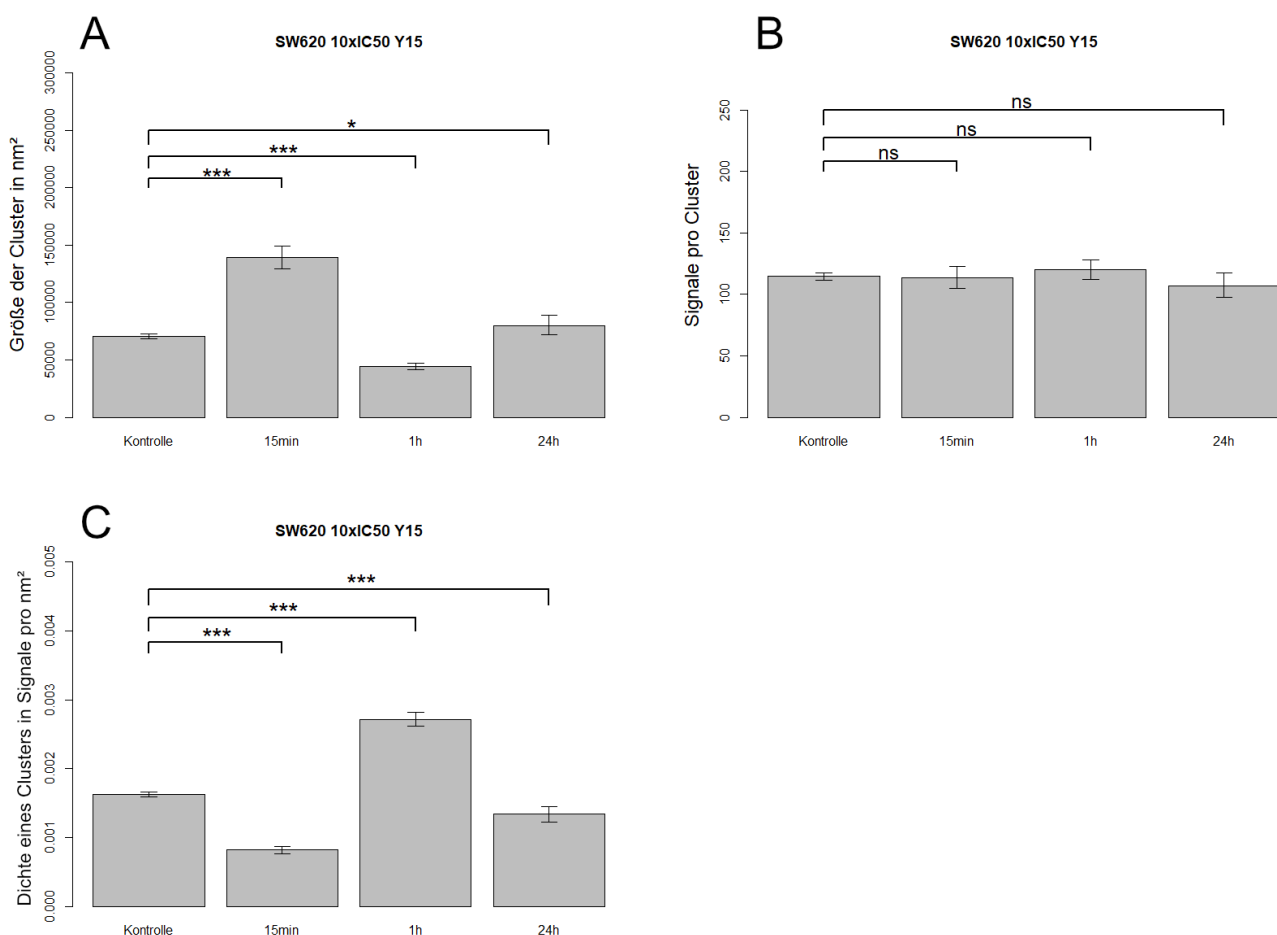


Abbildung 23: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 10 μM des Inhibitors Y15. Die Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten ist im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen sehr ähnlich und verhält sich fast identisch mit der Inkubation mit 5 μM des Inhibitors. Die Anzahl der detektierten Signale hat sich im Vergleich zu der Behandlung mit 1 μM und 5 μM , bei kurzen Inkubationszeiten, nicht verändert. Die späteren Effekte auf die Anzahl der Signale sind nach 24 Stunden allerdings deutlich geringer als bei der Behandlung mit 1 μM und 5 μM . Die hieraus resultierende Clusterdichte zeigt einen initialen Zerfall der Cluster. Nach einer Stunde hingegen gibt es eine deutliche Zunahme der Dichte, was der starken Verkleinerung der Cluster geschuldet ist. Nach 24 Stunden gibt es nur noch eine leicht verringerte Dichte.

2.4.4 Einfluss von Y11 SW620-Zellen

Bei der Behandlung der Krebszelllinie mit dem FAK-Inhibitor Y11 sind die Effekte ähnlich der Inkubation mit Y15. Auch hier, wie bei den anderen Messungen zuvor, ist eine Vergrößerung der Cluster bei 15 Minuten Behandlung zu verzeichnen, die sich bereits nach einer Stunde wieder verringert. Allerdings ist hier ein bleibender Rückgang der Größe nach längerer Inkubation festzustellen.

Bei der Anzahl der Signale ist ein konzentrationsabhängiger Rückgang über die Zeit zu beobachten, der sich nach 24 Stunden bei geringer Konzentration aufhebt. Bei 250 nM gibt es einen klaren Abwärtstrend über die gemessenen Zeiten.

Die hieraus resultierende Dichte der Cluster zeigt eine initiale Ausdünnung, da die Größe zunimmt, während die Anzahl minimal geringer wird. Durch die spätere Verringerung der Clustergröße kehrt sich dieser Effekt um und endet in einer höheren Dichte nach 24 Stunden.

Bei 250 nM des Inhibitors sind durch den Abwärtstrend in der Signalanzahl und die gleichzeitige Verkleinerung der Cluster nur minimale Effekte bezüglich der Dichte zu messen. Lediglich die schnelle Zellantwort in der Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten resultiert in einem deutlichen Zerfall der Cluster.

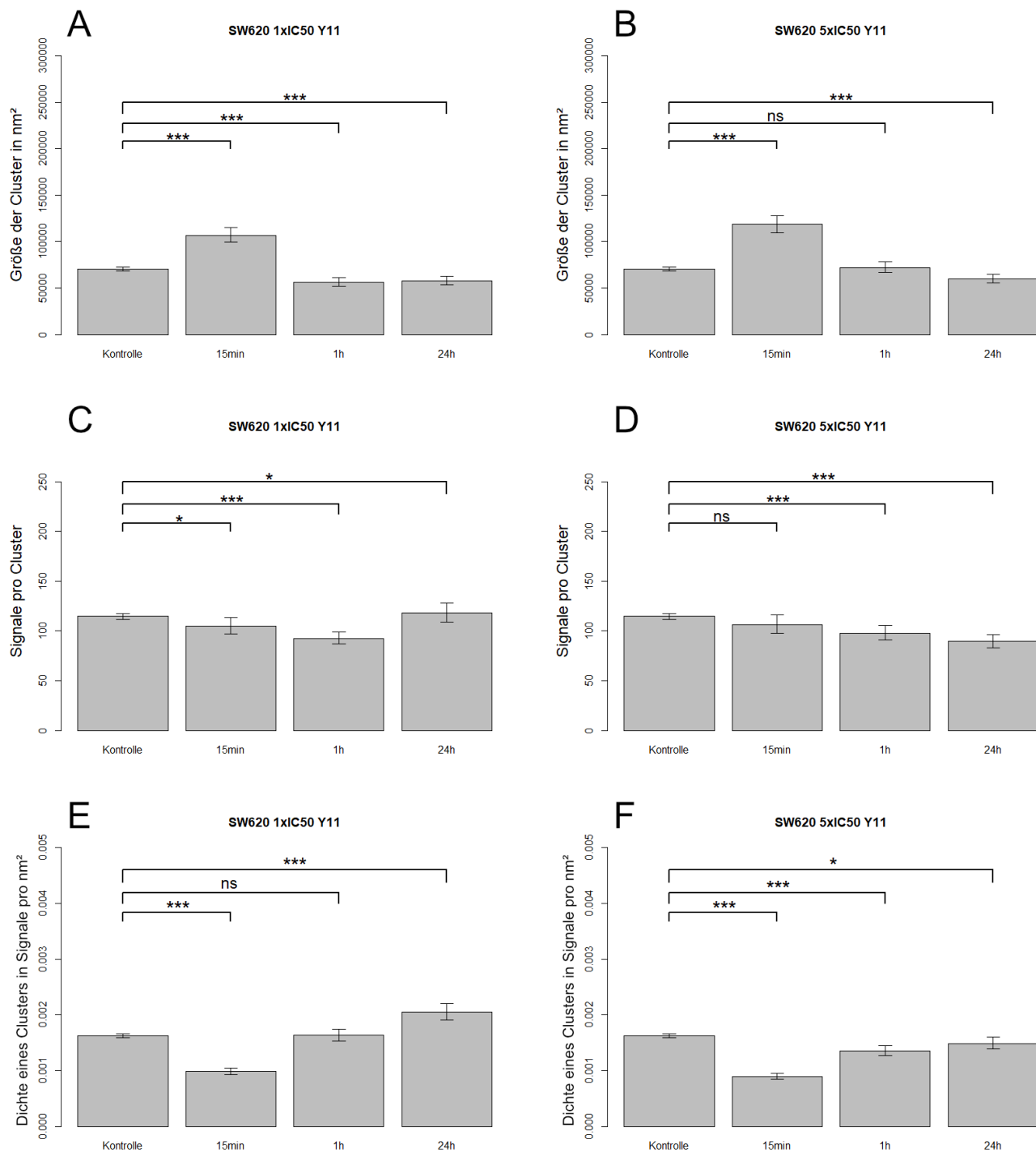


Abbildung 24: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 50 nM (A, C, E) und 250 nM (B, D, F) des Inhibitors Y11. Die Größe der FAK-Cluster ändert sich konzentrationsabhängig bereits nach 15 Minuten, wobei sich dieser Effekt nach längerer Inkubation umdreht und in einer Verkleinerung der Cluster resultiert. Die Anzahl an Signalen ändert sich ebenfalls konzentrationsabhängig, wobei eine Erholung nach 24 Stunden lediglich bei der geringeren Konzentration von 50 nM geschieht. Die aus diesen Daten resultierende Dichte an FAK in den Clustern zeigt einen initialen Zerfall der Cluster, obwohl sie später kleiner und dichter werden.

Bei höheren Konzentrationen von 500 nM des Inhibitors Y11 ist die Wirkung auf SW620 nach einer bzw. 24 Stunden umgekehrt, im Vergleich zu der Behandlung mit 250 nM. Die initiale

Änderung der Clustergröße hingegen zeigt einen deutlichen Unterschied zu niedrigeren Konzentrationen, was eine direkte Konzentrationsabhängigkeit bei der schnellen Zellantwort impliziert, da mit steigender Konzentration auch die Clustergröße zunimmt.

Bei der Anzahl an detektierten pFAK-Molekülen gibt es keinen klaren Abwärtstrend im Vergleich zur Behandlung mit 250 nM Y11. Vielmehr zeigt sich eine eher stagnierende Verringerung der Anzahl bis zu einer Stunde. Nach 24 Stunden Inkubation wird allerdings ein erwarteter Tiefstwert erreicht.

Die daraus resultierenden Dichten variieren sehr stark. Initial ist eine starke Verringerung der Dichte zu beobachten, wobei dieser Effekt bei einer einstündigen Inkubation komplett aufgehoben wird und auf das Niveau der Kontrolle zurückgeht. Nach einem Tag gibt es ebenfalls einen Abwärtstrend, was hauptsächlich durch die Erholung der Clustergröße bedingt wird.

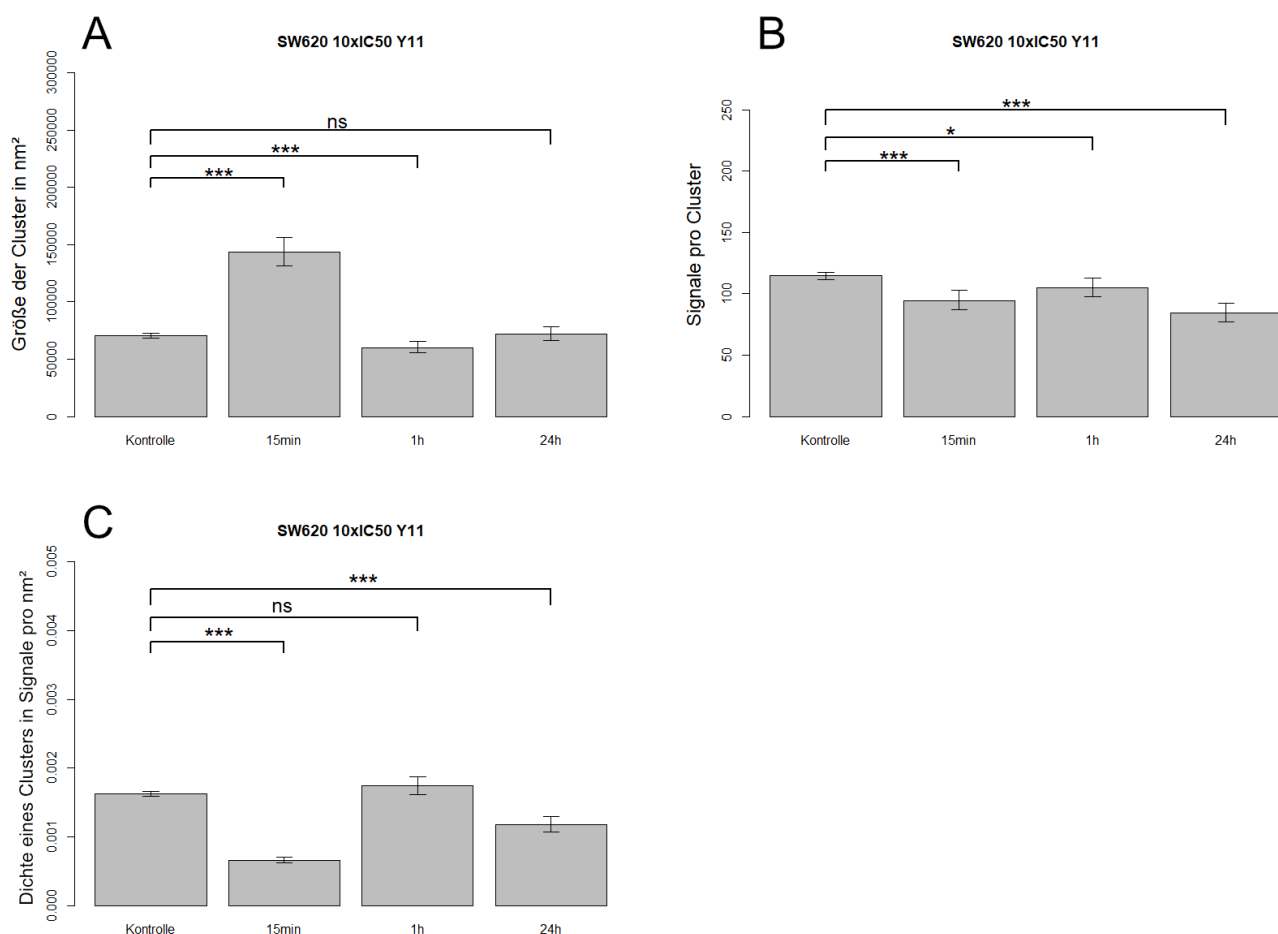


Abbildung 25: Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 500 nM des Inhibitors Y11. Die Vergrößerung der Cluster nach 15 Minuten ist im Vergleich mit geringeren Konzentrationen weiter gestiegen und liegt damit über der Größe, die bei 5 μ M erreicht wird. Die Anzahl der detektierten Signale ist ähnlich gegenüber den geringeren Konzentrationen und zeigt nur eine leichte Verringerung. Die hieraus resultierende Clusterdichte zeigt einen starken initialen Zerfall der Cluster, was sich nach einer Stunde wieder erholt. Nach einer 24-stündigen Inkubation ist erneut eine Verringerung der Dichte zu beobachten, allerdings im Vergleich zu der 15-minütigen Behandlung deutlich schwächer.

2.4.5 Zusammengefasste Ergebnisse der Einzelmolekülmikroskopie

Um die zuvor einzeln gezeigten Messdaten und deren Analyse vereinfacht und zusammengefasst darstellen zu können, wurden zunächst die verschiedenen Wirkungen der Inhibitoren auf pFAK-Cluster in drei unterschiedliche Effekte aufgeteilt. Die detektierten Signale können sich ändern, die identifizierten Cluster können ihre Größe ändern oder es kann auch eine Kombination aus beiden Effekten auftreten. Im schematischen Beispiel in Abbildung 26 sind diese Effekte vereinfacht dargestellt, um die Wirkung der FAK-Inhibitoren optisch zu klassifizieren.

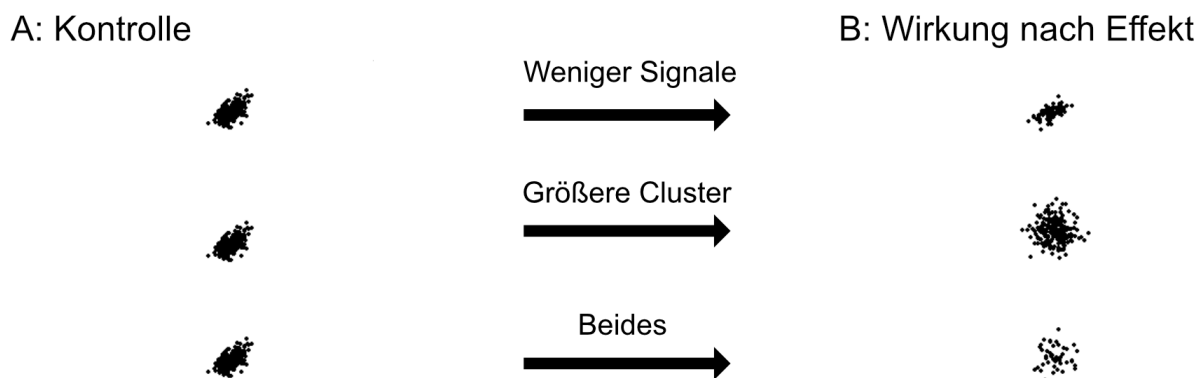


Abbildung 26: Schematische Darstellung der beobachteten Ergebnisse. In (A) ist eine simulierte ROI mit drei identischen Clustern gezeigt, die sich je nach möglichem Effekt in (B) verändern. Die analysierten Cluster können entweder bei gleichbleibender Größe ihre Signalanzahl variieren oder die Größe bei gleichbleibender Anzahl an Molekülen verändern. Beides verändert die resultierende Dichte direkt, weswegen die Kombination aus beiden Effekten als dritte Möglichkeit einen drastischen Unterschied in der Dichte bedeutet.

Bei den realen gemessenen Daten konnten alle diese Veränderungen beobachtet werden. Die jeweiligen Effekte, insbesondere in Kombination, zeigten einen großen Einfluss auf die errechnete Signaldichte innerhalb der Cluster. Bei der Zusammenführung aller erhobenen Clusteranalysen ist ein relativ ähnlich bleibendes Muster der Clusteränderung über die Zeit zu erkennen. In Abbildung 27 sind die verschiedenen Effekte der beiden Inhibitoren Y11 und Y15 auf die pFAK-Cluster von MEF- (A) und SW620-Zellen (B) zu sehen.

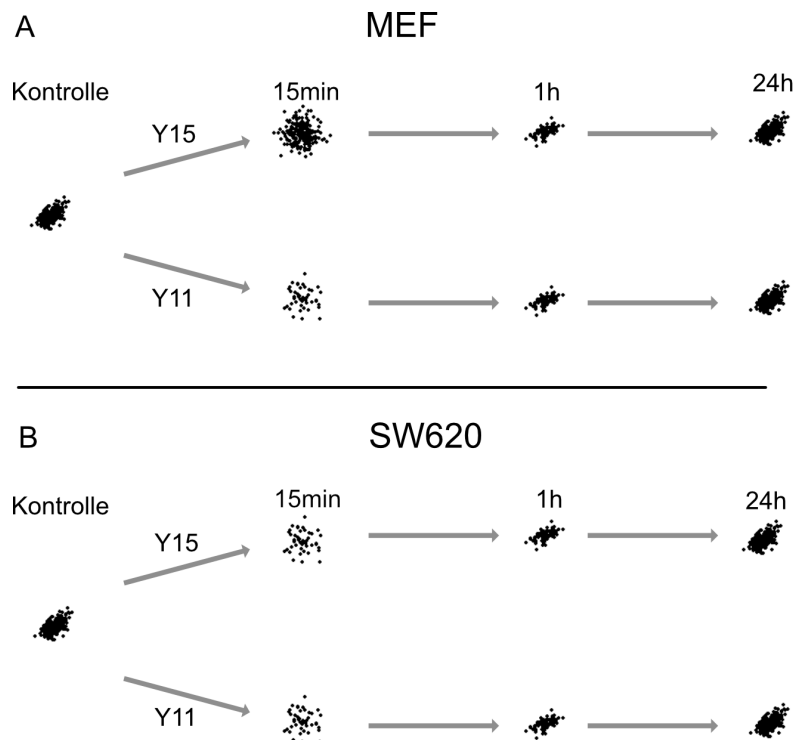


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Clusteränderung bei MEF- (A) und SW620-Zellen (B). Nach 15 Minuten ist bei beiden Zelltypen und Inhibitoren der größte Effekt zu sehen. Hier dünnen die Cluster stark aus, indem sie deutlich größer werden, wobei ihre Anzahl an pFAK-Moleküle aber gleich bleibt. Einzige Ausnahme bildet hier die Inkubation von MEF-Zellen mit dem Inhibitor Y15, bei dem es zwar ebenfalls zu einer Vergrößerung der Cluster kommt, sich aber zugleich die Anzahl der detektierten Moleküle drastisch erhöht. Dadurch entsteht eine leicht geringere Dichte. Nach einstündiger Inkubation ist eine vom Zelltyp unabhängige Verkleinerung der Cluster bei gleichzeitiger Verringerung der Signale zu beobachten, was in einer gleichbleibenden bis mittleren Erhöhung der Dichte resultiert. Nach 24 Stunden haben sich die meisten Effekte wieder normalisiert.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass es bei beiden Zelltypen nach einer 15-minütigen Behandlung mit den Inhibitoren zu einer Vergrößerung der Cluster, bei gleichbleibender Anzahl an Signalen, kommt. Dies resultiert in einer Abnahme der pFAK-Dichte in den Clustern. Einzige Ausnahme bildet hier die Wirkung des Inhibitors Y15 auf MEF-Zellen, bei der die Cluster eine erhöhte Anzahl von pFAK-Molekülen, bei gleichbleibender Größe, aufweisen. Hierdurch entsteht eine stark erhöhte pFAK-Dichte. Nach einer Stunde ist im Großteil der Messungen und Analysen eine Verkleinerung der Cluster, bei nahezu gleichbleibender Anzahl an pFAK-Molekülen zu sehen, was in einer gleichbleibenden bis mittleren Erhöhung der Dichte an Signalen innerhalb der Cluster resultiert. Die meisten Effekte normalisieren sich allerdings bei längerer Inkubation bei beiden Zelltypen, weswegen in Abbildung 27 zur besseren Veranschaulichung bei 24-stündiger Inkubation erneut der Ausgangscluster der Kontrolle dargestellt wurde.

3 Diskussion

Um eine bessere Übersicht und Einordnung der hier dargestellten Arbeit und Ergebnisse zu ermöglichen, wurde die Diskussion in vier Kapitel unterteilt.

Der erste Teil behandelt hauptsächlich die mikroskopische Auflösung, die physikalischen Gegebenheiten und die dadurch für diese Arbeit entstehenden Besonderheiten in Bezug auf die durchgeführten Messungen. Die verschiedenen Auflösungsgrenzen und die damit verbundene Sensitivität der erhobenen Daten sind ebenfalls in diesem ersten Kapitel dargestellt.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der weiterführenden Analyse der Messdaten sowie mit der Statistik und der damit verbundenen Mathematik hinter der Clusteranalyse. Hier werden sowohl die robusten automatisierten Quantifikationen als auch die Validierung des Systems mittels simulierter Daten besprochen.

Das dritte Kapitel fokussiert sich auf die Physiologie und beschäftigt sich daher mit der Bedeutung der gemessenen und analysierten Daten für die Zellen, den Organismus und schließlich für die Medizin. Es werden daher die verschiedenen Ergebnisse der Lebendzellfärbung und der Einzelmolekülmikroskopie kombiniert und in den Kontext der aktuellen Literatur und Forschung eingearbeitet.

Als Abschluss der Diskussion steht ein hauptsächlich methodischer Ausblick, wie die hier vorgestellte Clusteranalyse mittels Einzelmolekülmikroskopie und die automatisierte Auswertung in zukünftigen Arbeiten genutzt, skaliert und erweitert werden kann.

3.1 Optimierung durch erhöhte Auflösung und Sensibilität

Die Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie beträgt ungefähr 200 nm. Diese Grenze wird durch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes und die numerische Apertur des Objektivs bestimmt. Bereits 1873 beschrieb Ernst Abbe dieses Verhältnis, was in der bekannten Formel

$$d_{xy} = \frac{\lambda}{2NA}$$

resultierte [66].

Man könnte demnach durch Licht geringerer Wellenlängen eine höhere Auflösung erzielen, kurze Wellenlängen sind zum einen jedoch schädlicher für biologische Proben, zum anderen sind Glaslinsen eines Mikroskops ohnehin nur für Licht oberhalb von etwa 350 nm durchlässig.

Im Vergleich zu der Konfokalmikroskopie ist durch die Benutzung von TIRF keine Erhöhung der Auflösung gewonnen, da auch hier die Beugungsbegrenzung besteht. Denn auch hier werden Moleküle mit sichtbarem Licht angeregt, die schließlich ebenfalls sichtbares Licht emittieren. Allerdings ist sowohl die Anregung in der Z-Achse als auch die generelle Deposition von Energie pro μm^2 geringer. Dieser Unterschied resultiert letztlich in der Fähigkeit, das stochastische Blinken einzelner Fluorophore leichter zu detektieren. Außerdem besteht durch die wesentlich geringere Energiedeposition in der Probe ein deutlich geringeres Bleichen gegenüber des CLSMs. Durch den Zusatz der zeitlichen und stochastischen Komponente kann somit künstlich, das heißt mittels Berechnungen, die Auflösung erhöht werden. In unserem Fall erzielen wir eine Auflösung, mit der benachbarte Signale mit einem Abstand von bis zu 20 nm sicher unterschieden werden können. Diese Untergrenze basiert auf der Größe der verwendeten Antikörper. Da es möglich ist, dass mehrere Fluorophore denselben Antikörper binden, müssen Signale mit einem Abstand von weniger als 20 nm als ein Signal betrachtet werden, um die Antikörper und damit gebundenen Moleküle zu zählen, anstatt die Anzahl der tatsächlichen Fluorophore zu bestimmen.

Wie ebenfalls in Abbildung 28 zu sehen, ist es hiermit möglich zu erkennen, dass eine fokale Adhäsion (A) mehrere pFAK-Cluster enthält (B).

Dadurch ist eine Charakterisierung dieser Cluster auf molekularer Ebene ermöglicht worden, welche die Basis der hier gezeigten Ergebnisse liefert. Zudem resultiert die erhöhte räumliche Auflösung ebenfalls in einem weitaus sensitiveren *read-out* innerhalb der Zelle.

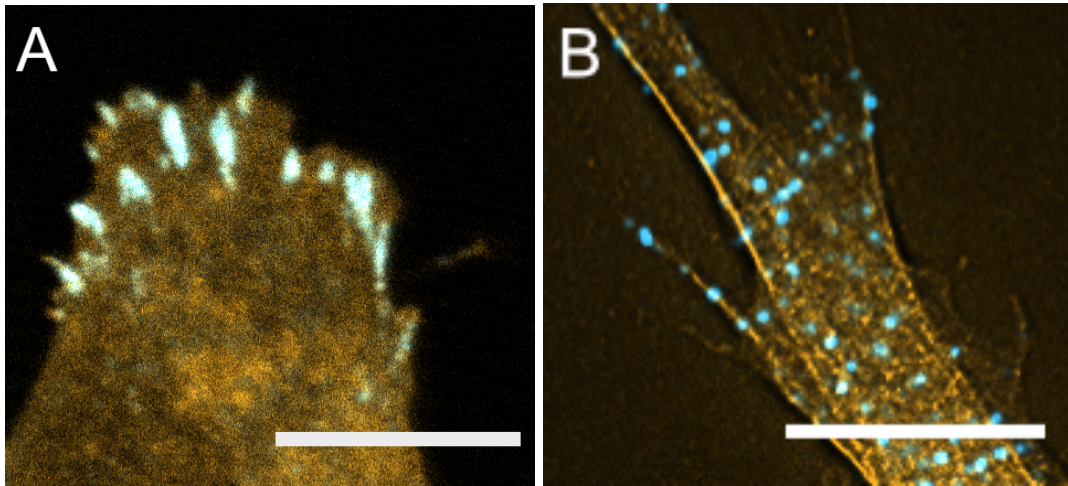


Abbildung 28: Fokale Adhäsion mit Antikörpermarkierter-pFAK und gefärbten Aktinsträngen. Die hier in blau dargestellten pFAK-Moleküle sind zusammengefasste Positionsdaten einzelner Proteine. Die hier orangefarben dargestellten Aktinstränge wurden mit Phalloidin gefärbt. Bei (A) ist eine solche fokale Adhäsion mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen; in (B) sieht man solche Strukturen durch eine TIRF-Aufnahme und anschließender Auswertung mittels ThunderSTORM (für pFAK) bzw. NanoJ (für Aktin).
Größenbalken = 10 μm

Bei der genauen Betrachtung der erhobenen Datensätze fällt nämlich auf, dass die gravierendsten Effekte bei Konzentrationen und Zeitwerten zu messen sind, die weit unterhalb der in Betracht gezogenen Werte konventioneller Inhibitoren-Tests liegen. Wie bei den Lebendzellfärbungen in Kapitel 2.1 gezeigt, gibt es zwar geringe Unterschiede bezüglich der Viabilität, je nach Zelltyp und Inhibitor, allerdings fallen hier die Effekte bei niedrigen Konzentrationen eher gering aus. Sowohl in den hier gezeigten Ergebnissen als auch in der etablierten Literatur sind die Effekte insbesondere auf Krebszellen erst mit deutlich höheren Konzentrationen und Zeitwerten zu beobachten und zu messen [58, 62].

Zusätzlich zeigen sich Reaktionen auf die Inhibitoren bei Betrachtung ganzer Zellen erst nach 12-24 Stunden. Diese lassen sich zum Beispiel durch Formänderung und Ablösen, wie bei Apoptose üblich, beobachten. Im Gegensatz dazu gelingt es mit der hier vorgestellten Analyse sehr frühe Effekte deutlich sichtbar zu machen, die sich auf molekularer Ebene abspielen.

Insgesamt ist der *read-out* der Lebendzellfärbungen im Vergleich zu anderen, insbesondere der hier gezeigten Analyse, wenig sensitiv. Durch den binären *read-out*, welcher Zellen lediglich als lebend oder tot einstufen lässt, sind keine feinen Unterschiede mit verschiedenen Effekten zu beobachten. Die Mechanismen, die zu einem Zelltod führen, können hier nicht aufgelöst oder verstanden werden. Somit bleibt die Frage, woran die Zelle letztlich stirbt, unbeantwortet.

Dagegen ermöglicht die hier dargestellte Methode zur Detektion, Identifikation und Charakterisierung von Clustern einzelner Moleküle eine intrazelluläre Messung mit einem *read-out*, der im Gegensatz zu einem binären System, fließende Übergänge von Effekten und Wirkungen auflösen kann. Sie erbringt also nachweislich eine enorm erhöhte Sensitivität sowohl bezüglich der Konzentrationen als auch der Inkubationszeiten. Die intrazellulären Vorgänge, insbesondere die

der fokalen Adhäsionen und die damit verbundenen Signalwege, reagieren wesentlich schneller und empfindlicher auf äußere Einflüsse, wie auf die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren, als es bisherige Messmethoden aufzulösen vermögen.

Die von Golubovskaya et al. aus dem Jahre 2008 und 2012 gezeigten Ergebnisse zeigen, je nach Zelltyp, erst bei einer Inkubation über 24 Stunden mit einer Konzentration, die dem 50-fachen des IC_{50} -Wertes entspricht, ein deutlichen Effekt auf das Überleben der Zellen [58, 62]. Die Adhäsionsraten in diesen Publikationen zeigen ebenfalls erst bei ähnlich hohen Konzentrationen Effekte.

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich, molekulare Inhibition direkt in der Zelle zu messen, wie es bisher nur *in vitro* möglich war. Darüber hinaus lassen sich vor allem die unmittelbaren Effekte (räumlich oder zeitlich) auf die Inhibition beobachten. Damit wird es also möglich, die Wirksamkeit eines Inhibitors direkt in der korrekten Umgebung des Zielproteins zu charakterisieren, was für die Wirkstoffentwicklung von unschätzbarem Wert ist.

Dabei besteht jedoch weiterhin die Notwendigkeit, die Auswirkung des Inhibitors auf die Physiologie der Zelle oder des Organismus zu untersuchen.

Was eventuelle Veränderungen an einzelnen Proteinen bedeutet, kann vor allem zu späteren Zeitpunkten enorme Veränderungen der gesamten Zelle oder gar Zellkultur mit sich ziehen. Durch eine Langzeitmessung der beiden Zelltypen konnten je nach Konzentration Zeitwerte bestimmt werden, ab denen sich große Veränderungen in der Zellmorphologie und der Viabilität der Zellen zeigen. Nach 15 Stunden ist eine erhebliche Wirkungen auf die Zellen zu beobachten, wenn sie mit der 50-fachen IC_{50} -Konzentration behandelt wurden.

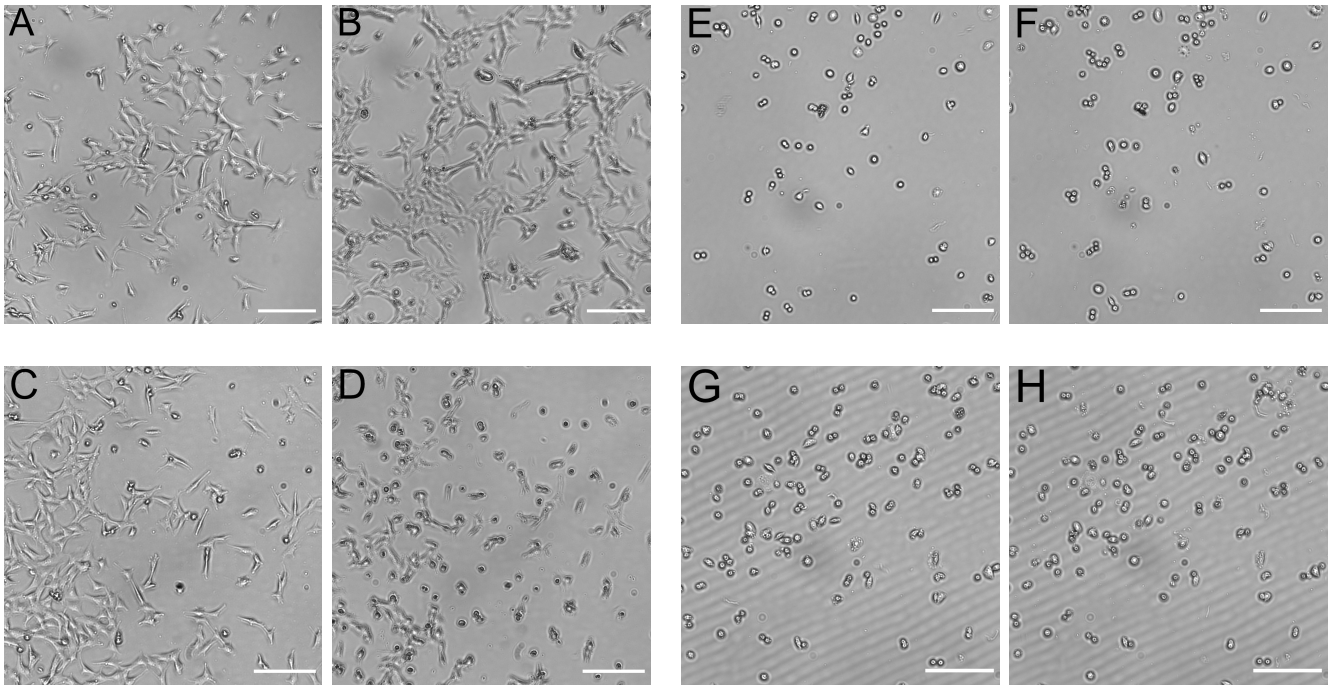


Abbildung 29: Langzeitmessung lebender Zellen (MEF: A-D ; SW620: E-H) mit Inkubation von 50 μ M Y15 (C-D ; G-H). Die Kontrollen (A-B ; E-F) zeigen selbst nach 22 Stunden keine nennenswerten Unterschiede. Lediglich die schneller wachsenden MEF-Zellen haben nach dieser Zeit eine größere Fläche auf dem Deckglas besiedelt. Bei der Behandlung mit 50 μ M Y15 gibt es bereits nach 15 Stunden eine Abrundung und Ablösung der MEF-Zellen. Bei den kanzerösen SW620-Zellen ist ebenfalls kaum ein Effekt zu sehen.
Größenbalken = 200 μ m

Nach einer solchen großen Veränderung und Wirkung auf die gesamte Zellkultur, enthält eine Clusteranalyse einzelner Proteine nur noch einen geringen Informationsgehalt, da schon unzählige andere Mechanismen verändert, an- und ausgeschaltet wurden. Daher ist ein so sensitiver *read-out* nur bei diesen frühen Zeitwerten und so geringen Konzentrationen sinnvoll, wie sie hier in den Ergebnissen gezeigt wurden. Für spätere sowie für höher dosierte Zelluntersuchungen sind andere Messverfahren nötig. Sie sollten sich daher nicht gegenseitig ersetzen, sondern vielmehr ergänzen.

3.2 Clusteranalyse

Um die Verlässlichkeit der Messungen zu garantieren, wurde die Methode der Clusteranalyse, welche in Kapitel 2.3.1 angewendet wurde, zuvor durch Simulationen validiert.

Trotz der hohen Variabilität der simulierten und realen Messdaten, sind in beiden Systemen optisch nahezu identische Cluster zu finden (Abb. 30, schwarze Pfeile). Dieser Schritt der Überprüfung ist notwendig, da sich trotz der hohen Variabilität, insbesondere in den simulierten Daten, auch nahezu identische Cluster im Vergleich zu den realen Messdaten befinden sollten. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Kontrolle und Überprüfung der verschiedenen Analysen nicht nur robust gegenüber Variabilitäten, sondern auch geeignet für die erhobenen Daten ist. Durch die bewusst sehr variabel gehaltenen Parameter bezüglich der Dichte, Anzahl und Größe der Cluster, konnten die in Frage kommenden Algorithmen überprüft und schließlich ein Favorit bestimmt werden.

Durch den Einsatz des HDB-SCANs mit vorangehender Dichtemaske, konnten mehrere Randbedingungen und Probleme eliminiert werden. Die erste Randbedingung ergibt sich durch die hohe Variabilität der Größe und somit oftmals der Dichte der Cluster für den HDB-SCAN. Bei der stichprobenhaften optischen Kontrolle der Auswertung konnte beobachtet werden, dass regelmäßig Cluster identifiziert und charakterisiert wurden, die durch unabhängige manuelle Kontrolle nicht als solche aufgenommen wurden. Dieser Effekt ist auch in Abbildung 17 zu sehen, bei der durch die Deletion des Hintergrundes ein Cluster mit zu geringer Dichte aussortiert wurde.

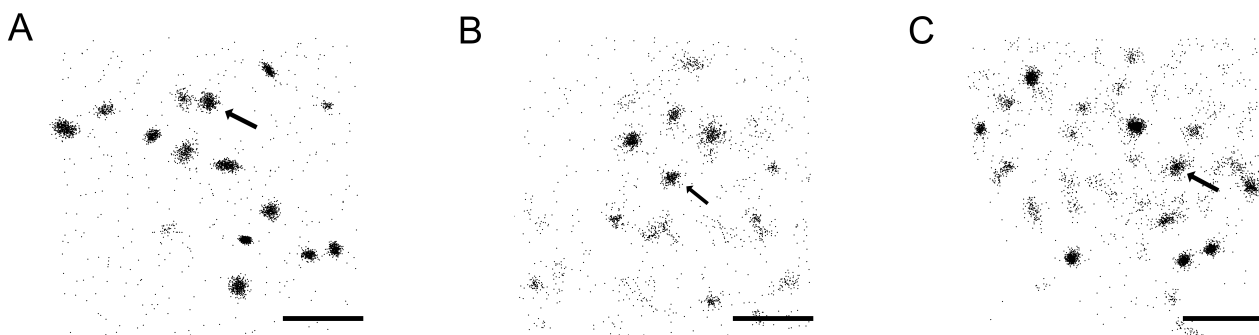


Abbildung 30: Gegenüberstellung von simulierten und realen Messdaten in Form eines Punktediagramms. (A): Simulierte ROI; (B): Reale Messdaten aus einer MEF-Zelle; (C): Reale Messdaten aus einer SW620-Zelle. Bei allen drei gezeigten ROI sieht man die Variabilität des sowohl realen als auch simulierten Systems deutlich im Bezug auf die Clustergröße und -dichte. Die mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Cluster in der simulierten und den realen ROI sind optisch sehr ähnlich. Größenbalken = 1 μm

Die zweite Randbedingung wird mit der Wahl des HDB-SCANs gegenüber des DB-SCANs ausgeschaltet, da der hierarchische DB-SCAN die Clustergröße selbst für jeden zu identifizierenden Kandidaten errechnet. Beim klassischen DB-SCAN muss der Endnutzer ein Größenlimit setzen.

Obwohl dies auch vorteilhaft sein kann, ist es in unserem System nicht förderlich, da die zu beobachteten Cluster eine sehr starke Variabilität aufweisen und die Effekte von FAK-Inhibitoren auf diese Cluster bisher unbekannt waren. Von einem Größenlimit auszugehen könnte also einen von Menschenhand erstellten Selektionsfilter bedeuten, der die erhobenen Daten somit unzulässig macht.

Ein weiterer, wichtiger Selektionsfilter des HDB-SCANs ist die Bedingung, dass eine ROI mehr als einen Cluster enthalten muss. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, können keine singulären Cluster gefunden werden. Daher ist es beim Einsatz dieser Auswertung zwingend erforderlich darauf zu achten, dass die Messdaten eine Mindestanzahl von zwei Clustern pro ROI besitzen.

Insgesamt konnte somit ein robustes und automatisiertes System geschaffen werden, um eine große Anzahl an Daten zu verarbeiten, wie die hier über 9000 analysierten Cluster. Gleichzeitig ist durch die Implementierung dieses modularen Systems eine hohe Skalierbarkeit möglich, welche später in Kapitel 3.4.1 näher betrachtet wird.

3.3 FAK-Inhibition - eine gute Idee?

Grundsätzlich wird die FAK, vor allem in der phosphorylierten Form an den fokalen Adhäsionen, als einer der großen Ankerpunkte für die Adhäsion und Migration von Zellen angesehen [12, 13, 40, 61]. Zudem ist ein bekanntes Merkmal, und zugleich wichtiger Unterschied zwischen kanzerösen und gesunden Zelllinien, eine erhöhte FAK-Expression und -Aktivität [67, 68]. Aus diesem Grund gibt es seit Jahren eine ständige Forschung an der Inhibition der FAK, da hier ein potenzieller Therapieansatz gesehen wird [69, 70, 2, 64, 71, 63, 72, 1]. Diese Ansätze zielen hauptsächlich auf die Kinaseaktivität der FAK ab, da diese unter anderem nachweislich die Expression und Aktivität von p53, einem wichtigen Apoptosefaktor, beeinflusst [73, 74, 75, 76]. Es gibt auch Bemühungen, die im Zellkern befindliche FAK in ihrer Aufgabe der Genregulation zu beeinflussen [46, 1].

Daneben gibt es auch zahlreiche Ansätze die FAK in ihrer initialen Aktivierung durch die Autophosphorylierung an Tyrosin 397 zu inhibieren. Deramaudt et al. zeigten 2011 bereits, dass die Migration von MEF-Zellen direkt abhängig von der Phosphorylierung des Tyrosins 925 ist [77]. Da diese spätere Phosphorylierung in Abhängigkeit von der initialen Autophosphorylierung des Tyrosins 397 geschieht, ist davon auszugehen, dass ein spezifischer Inhibitor für Tyr 397 ebenfalls die Migration von MEF-Zellen stört. Das lässt den Rückschluss zu, dass die initialen Effekte des Inhibitors auf die Dichte der pFAK innerhalb der Cluster einen Hinweis auf die Adhäsions- und Migrationsfähigkeiten der Zellen geben.

Bei der Behandlung von MEF-Zellen mit dem Inhibitor Y11 ist eine deutliche Abnahme der Dichte nach bereits 15 Minuten zu beobachten, da eine starke Vergrößerung der Cluster bei gleichbleibender Anzahl an pFAK-Molekülen zu messen ist. Dieser Effekt ist ähnlich, jedoch schwächer bei der Inkubation mit Y15. Die Adhäsion und Migration von gesunden Zellen zu inhibieren ist jedoch nicht das Ziel, sondern eine unvermeidliche Randerscheinung einer potenziellen Krebstherapie. Wesentlich entscheidender ist daher der Effekt auf kanzeröse Zelllinien im Vergleich zu normalen Zelllinien.

Daher müssen die Einzelmoleküldaten nicht nur untereinander verglichen werden, um Unterschiede zwischen normalen und kanzerösen Zelllinien zu analysieren. Ein sehr wichtiger Teil besteht auch in der Einordnung der neuen Erkenntnisse in bereits vorhandene Prozesse und Daten. Daher wurden alle für die Einzelmolekülmikroskopie verwendeten Konzentrationen an Inhibitoren und Zeitwerte der Inkubationen ebenfalls für eine Lebendzellfärbung der jeweiligen Zellen verwendet. Die in Kapitel 2.1 gezeigten Ergebnisse geben im Gegensatz zu der Analyse einzelner Proteine einen guten Überblick über die Viabilität einer ganzen Zellkultur und ergänzen daher die wesentlich sensitiveren Clusteranalysen.

Im Vergleich zeigen die Ergebnisse der Lebendzellfärbungen im Kapitel 2.1 nur minimale Unterschiede zu den aufgrund aktueller Literatur erwarteten Ergebnissen [58, 62, 6, 78, 5].

Da Krebszelllinien, wie die hier verwendeten SW620-Zellen, häufiger für Tests und Arbeiten mit

FAK-Inhibitoren verwendet werden, sind Vergleiche zwischen diversen Publikationen und dieser Arbeit leichter möglich. Beispielhaft hierfür ist in Abbildung 31 ein MTT-Test aus der Publikation von Golubovskaya et al. 2012 zu sehen [62].

Hier wurden die Zellen, ähnlich zu den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten, für 24 Stunden mit den jeweiligen Konzentrationen behandelt. Ein entscheidender Unterschied ist, dass in der unten gezeigten Darstellung des Versuchs identische molare Konzentrationen der beiden Inhibitoren verwendet wurden. Im Gegensatz dazu wurde sich in den hier vorgestellten Ergebnissen darauf fokussiert, gleiche Vielfache des jeweiligen IC_{50} -Wertes zu verwenden, da dieser Aufschluss über den zu erzielenden Effekt gibt.

Dadurch ist in Abbildung 31 ein deutlicherer Unterschied der beiden Inhibitoren Y11 und Y15 zu beobachten.

Bei den Lebendzellfärbungen wurden im Vergleich zu Arbeiten von beispielsweise Golubovskaya et al. teilweise zusätzlich noch höhere Konzentrationen verwendet und es ist ein starker Rückgang der Viabilität bei 100 μ M des Inhibitors zu beobachten [62, 58]. Bei den in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnissen wurde allerdings auf so hohe Konzentrationen verzichtet, weswegen die Effekte einer höheren Inkubation mit Y11 und Y15 in Abbildung 31 dargestellt wurden [62].

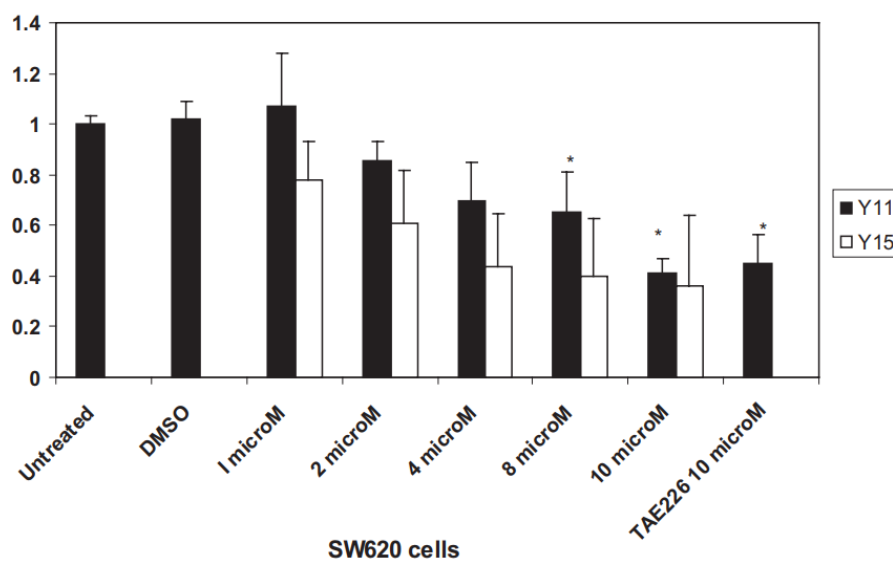


Abbildung 31: Darstellung eines MTT-Tests an SW620-Zellen unter Einfluss von Y15 und Y11 nach 24 Stunden. Quelle des Bildes: Golubovskaya et al. 2012 [62]

Grundsätzlich muss erwähnt werden, dass bei den in dieser Dissertation angefertigten Ergebnissen, die gesunden Zellen eine deutlichere Verringerung der Viabilität, im Vergleich zu den kanzerösen SW620-Zellen, aufweisen. Dadurch ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Behandlung mit den Inhibitoren Y11 und Y15 bei normalen Zellen einen größeren Schaden anrichten, als bei kanzerösen Zellen.

Aufgrund von fehlenden Publikationen ist kein Vergleich der erhobenen Daten bezüglich der

Inhibition von MEF-Zellen mit den Inhibitoren Y11 und Y15 möglich.

Eine weitere Besonderheit, die im Zuge der Clusteranalyse identifiziert wurde, ist die Charakterisierung der pFAK-Cluster im direkten Vergleich der Kontrollen von MEF- und SW620-Zellen. Obwohl in der Literatur und in vorangehender Forschung vielfach die erhöhte Expression und Aktivität von FAK in Krebszellen nachgewiesen wurde, konnten keine Unterschiede in den pFAK-Clustern von MEF- und SW620-Zellen festgestellt werden [67, 79, 59, 80]. Dieses Erkenntnis lässt den Schluss zu, dass die Adhäsion bei Krebszellen entweder nicht verändert ist, oder zumindest die phosphorylierte Form der FAK nicht in direkter Weise daran beteiligt ist. Da sich diese Arbeit jedoch ausschließlich auf diesen Bereich fokussiert, ist eine Veränderung der FAK im Bezug auf Expression und Aktivität in anderen Bereichen der Zelle nicht auszuschließen. Wie zuvor beschrieben, gibt es auch therapeutische Ansätze, die FAK im Zellkern sowie die Kinaseaktivität der zytosolischen FAK zu beeinflussen.

Durch die starke Ähnlichkeit in den fokalen Adhäsionen kann man folglich von einem ähnlichen Effekt bei der jeweiligen Behandlung der unterschiedlichen Zellen ausgehen.

Bei der Kombination von Lebendzellfärbungen und Einzelmoleküldaten sowie den Literaturwerten bezüglich der Ablösungsrate von Zellen bei der Behandlung mit den hier gewählten Inhibitoren, kann die Schlussfolgerung angestellt werden, dass die Verringerung der Dichte innerhalb der FAK-Cluster in den fokalen Adhäsionen zu einer Verminderung der Adhäsionsfähigkeit führt [58, 62, 81]. Durch die verschiedenen Experimente ist daher gut nachvollziehbar, wie bei Behandlungen mit höheren Konzentrationen MEF-Zellen abgelöst werden können und diese somit Apoptose initiieren. Da bei kanzerösen Zellen oftmals eine Unfähigkeit vorliegt, diesen programmierten Zelltod einzuleiten, kann ein durch Inhibition vermehrtes Ablösen der Zellen, oder gar, wie Yano et al. 2004 beschrieben haben, eine Erhöhung der Migration dazu führen, dass sich Krebszellen schneller und weiter verbreiten können [17, 82]. Daher ist an dieser Stelle auf jeden Fall eine Validierung dieser Hypothese notwendig, die eine mögliche erneute Anheftung von Krebszellen nach Behandlung und Ablösung sowie eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen für möglich hält.

Zusammenfassend sind die Reaktionen sowohl im Bereich der Lebendzellfärbungen als auch innerhalb der Clusteranalyse und insbesondere deren weiterführende Interpretationen das exakte Gegenteil des eigentlichen Ziels eines therapeutischen Ansatzes zur Behandlung von Krebs. Daher ist es zwingend erforderlich, diese Zellantworten weiter zu erforschen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die einzelnen Experimente noch nicht ausreichend miteinander verknüpft worden, weshalb die hier gezeigte Clusteranalyse einen weiteren wichtigen Schritt bildet, die Gesamtheit an Wirkungen bei einer FAK-Inhibition als therapeutisches Ziel zu verstehen. Vor allem die enorme Erhöhung der Sensitivität und der damit verbundenen räumlichen und zeitlichen Auflösung geben neue Einblicke, mit welchen Kinetiken eine Zelle auf eine solche Behandlung reagiert, bevor es 'von außen' sichtbar wird.

Damit lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Einzelmolekülmikroskopie und der dar-

auf aufbauenden Clusteranalysen der pFAK einen schnellen *read-out* nach bereits 15 Minuten Inkubationszeit erlauben. Bei den bisher häufiger verwendeten Zeitwerten von einer bzw. 24 Stunden ergeben sich auf Einzelmolekülebene keine großen Änderungen. Durch die enorme Verknüpfung der FAK, insbesondere mit p53 und anderen *housekeeping* Proteinen, sind allerdings nach einer so langen Zeit der Inkubation diverse Effekte und Zellantworten möglich, die sich nicht mehr ausschließlich in der Clustercharakterisierung widerspiegeln.

Als letzter großer Punkt konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede sowohl in der Kontrolle als auch in der jeweiligen Behandlung von MEF- und SW620-Zellen nur minimal sind. Insbesondere die Anzahl der pFAK-Moleküle unterscheidet sich kaum zwischen der spontan immortalisierten und der kanzerösen Zelllinie. Aber auch die Zellantworten der beiden verwendeten Kulturen ähneln sich sehr. Die erhöhte Expression und Aktivität von FAK in Krebszellen spiegelt sich also nicht in der Organisation der fokalen Adhäsionen wider, oder führt zumindest nicht zu einer anderen Organisation dieser Strukturen.

3.4 Ausblick

3.4.1 Ein variables System - mit viel Potenzial

Bei der hier präsentierten Vorgehensweise, von der mikroskopischen Aufnahme der Zellen auf Einzelmolekülebene bis hin zur Clusteranalyse von Positionsdaten anstatt einer Bildanalyse, handelt es sich um ein durchweg modulares System. Das bedeutet, die einzelnen Sektionen dieser Arbeit können separat voneinander variiert und optimiert werden. Es bedeutet auch, dass die einzelnen Abschnitte beliebig skaliert werden können. Die Automatisierung der Clusteranalyse ist beispielsweise nahezu ausschließlich von der Geschwindigkeit des genutzten Computers abhängig. Bei einem Computercluster oder ähnlichen Systemen könnten somit beliebig viele Analysen parallel durchgeführt werden.

Ähnlich ist die vorangehende Vorbereitung der Bilddateien in FIJI zu handhaben. Auch hier können in Zukunft diverse Optimierungen und Automatisierungen die Skalierung der Methode enorm erhöhen.

Bei der eigentlichen Mikroskopie hingegen ist eine Parallelisierung schwieriger, da hier die verwendete Hardware der limitierende Faktor ist. Jedoch ist eine Parallelisierung der Mikroskopie bei der Skalierbarkeit dieser Methode auch nicht zwingend nötig. Da die Möglichkeit besteht, an fixierten Zellen zu messen, können solche Messungen vollautomatisiert durchgeführt werden; sie sind daher nicht zeitlich begrenzt oder empfindlich.

Es gibt zudem auch erhebliche Vorteile, die in Zukunft genutzt werden können. Zum einen ist es äußerst wichtig zu erwähnen, dass in der Arbeit jeweils nur ein Fluoreszenzfarbstoff zur Analyse der Cluster verwendet wurde. Dies bedeutet, dass die erarbeitete und gezeigte Methode ebenfalls mit Kolo-kalisationen auf Einzelmolekülebene kombinierbar ist. Eine parallel durchgeführte Clusteranalyse zweier benachbarter Proteine, wie in dem hier ausgeführtem Beispiel der FAK und Src, würden Einsichten in *down*- und *upstream*-Effekte erlauben. Somit ist die gezeigte Einzelmolekülmikroskopie und die darin enthaltene Clusteranalyse ebenfalls mit Kolo-kalisationsstudien oder anderen klassischen lichtmikroskopischen Ansätzen und Experimenten kombinierbar.

Ein weiterer sowie wichtiger Vorteil der dargestellten Methode ist, wie oben bereits erwähnt, die Skalierbarkeit und Parallelisierung. In dem Übergang von der Grundlagenforschung zur Anwendbarkeit im pharmazeutischen Kontext, stellen diese beiden Begriffe in der Regel die größten Probleme dar, denn was als *proof of concept* funktioniert, muss nicht unbedingt in der etablierten Forschung, in der Medizin, oder gar im Industriemaßstab anwendbar sein. Daher wird im Kapitel 3.4.2 sowohl der inhaltliche als auch der methodische Ausblick auf die nächsten Jahre im Detail dargestellt. Hierbei werden nicht nur direkte Entwicklungsmöglichkeiten, sondern auch das zukünftige Potenzial berücksichtigt.

3.4.2 Was passiert in 5 bis 10 Jahren?

Die Langzeitprognose neuer Methoden, vor allem im Bereich der präklinischen Studien, stellt immer eine schwierige Aufgabe dar. Neben den unmittelbaren Verbesserungen, die zuvor beschrieben wurden, kommt daher die Frage auf, wofür diese Methode in dieser oder abgeänderter Form zusätzlich benutzt werden kann. Abgesehen von der bereits erklärten Modularität ist die Methode auch sehr flexibel in Bezug auf die zu untersuchenden Proben. Da es sich um keine klassische Bildanalyse mehr handelt, ist der Ursprung der Rohdaten demnach von geringer Bedeutung. Im Detail bedeutet das eine Unabhängigkeit der Mikroskopie gegenüber ihrer Auswertung. Die Analyse bedarf also keiner Anpassung an die jeweiligen Datensätze, sondern funktioniert unabhängig davon, welche molekularen Strukturen gemessen werden.

Durch die äußerst hohe Sensitivität sowohl in der zeitlichen Komponente als auch bei den Konzentrationen, oder ebenfalls bei anderen Behandlungen, sind wesentlich feinere und höher aufgelöste Messungen möglich als bisher. Intrazelluläre Vorgänge, wie das Formen einer fokalen Adhäsion, die Rekrutierung einzelner Proteine oder die Reorganisation diverser Strukturen, können auf Einzelmolekülebene betrachtet und genauestens analysiert werden.

Die erste große Prognose dieser Methode ist der Übergang zwischen Endpunktbestimmung und Lebendzellfärbungen. In den zeitlichen Bereichen, in denen die hier dargestellte Methode zelluläre Vorgänge auflösen kann, ist eine Messung lebender Zellen daher absolut möglich und sinnvoll. Allerdings ist an dieser Stelle eine methodische Veränderung des Versuchsaufbaus notwendig, denn in dem hier gezeigten Beispiel der FAK-Markierungen wurden Antikörper verwendet, weshalb die zu analysierenden Zellen zuvor fixiert und permeabilisiert wurden. In Zukunft könnte man daher photoaktivierbare oder lichtsichtbare Proteine, wie etwa Dronpa oder EOS nutzen [83, 84, 85]. Solche Proteine erlauben die Analyse lebender Zellen auf molekularer Ebene und ermöglichen somit eine Auflösung von schnell ablaufenden Vorgängen in Echtzeit.

Durch die Etablierung von Lebendzellfärbungen im Bereich der Einzelmolekülmikroskopie sind wiederum viele weitere Experimente und Forschungsansätze möglich. Bei einer Echtzeitmessung können im Vergleich zu klassischen Endpunktbestimmungen auch sehr kurzweilige oder schnelle Prozesse aufgenommen und aufgelöst werden. Zusätzlich bieten Lebendzellfärbungen eine wesentlich höhere Genauigkeit und biologische Relevanz.

Die zweite Prognose für diese Art der Mikroskopie ist die weitere Einbettung in die bestehende Forschung. Hier gibt es zwei unterschiedliche Aspekte. Zum einen entsteht in der aktuellen Medikamentenforschung und vor allem in präklinischen Studien immer mehr die Notwendigkeit, potenzielle Kandidaten bestmöglich zu beschreiben und vorzuselektieren, da spätere klinische Phasen mit einem enormen zeitlichen und finanziellen Aufwand einhergehen. Daher ist die Einbettung zusätzlicher, sensibler Methoden der Charakterisierung und vor allem die Wirkung solcher Kandidaten von großer Bedeutung.

Der zweite Aspekt dieser zweiten Prognose bezieht sich auf die Zielsetzung, hauptsächlich in der

Krebsforschung, aber auch generell in der Medikamentenforschung, einen wesentlich individuelleren Weg der Therapie einzuschlagen. Bei der eigentlichen Behandlung eines Patienten wurde daher der Begriff 'personalisierte Medizin' und 'Präzisionsmedizin' geprägt [86, 87, 88, 89]. Allerdings gibt es wenige Gründe, warum die Personalisierung nicht schon in der Identifikation, Charakterisierung und Analyse potenzieller Medikamente beginnen sollte. An dieser Stelle ist es von großem Vorteil, dass die hier vorgeschlagene mikroskopische Analyse sowohl modular, als auch unabhängig von den Rohdaten agiert. Im Detail hat dies zur Folge, dass es keine großen Änderungen der Methode bedarf, um beispielsweise die Krebszellen verschiedener Patienten zu untersuchen. Gleichzeitig können große Änderungen in den Ergebnissen erzielt werden, wodurch Patienten mit unterschiedlichen Krebsarten geholfen werden können.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Embryonale Mausfibroblasten (MEF)

Die in dieser Arbeit kultivierten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) wurden in DMEM/Ham's F-12 (1:1) mit 10 % (v/v) FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ passagiert. Embryonale Mausfibroblasten sind adhärenzte Bindegewebszellen, die dank ihrer Kollagensekretion unter anderem als *feeder layer* verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die MEF-Zellen allerdings als alleinstehende 2D-Zellkultur kultiviert. Der Hauptgrund für die Verwendung von MEF-Zellen in dieser Arbeit ist ihre besonders ausgeprägte Form bezüglich fokaler Adhäsionen (siehe Abb. 13).

4.1.2 Humane Darmkrebszellen (SW620)

Die Zellkultur der humanen Darmkrebszellen (SW620) wurde in Leibovitz's L-15 mit 10 % (v/v) FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Für diese Arbeit wurden auch diese Zellen in einer 2D-Zellkultur kultiviert. Die SW620-Zellen wurden für diese Arbeit, zusätzlich zu den MEF-Zellen, gewählt, um einen Vergleich zwischen gesunden und kanzerösen Zellen zu erhalten. Dies gilt insbesondere bei der Einzelmolekülmikroskopie der FAK, da die Expression und Aktivität von FAK in Krebszellen deutlich erhöht ist [90, 68].

4.1.3 Zellpassage

Die Zellen wurden jeweils bei 80-90 % Konfluenz passagiert. Adhärenzte Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen und anschließend in 1 mL Trypsin/EDTA bei 37 °C (3 min für MEF, 6 min für SW620) inkubiert, um die Zellen zu lösen. Mit der Zugabe von 3 mL des jeweiligen Mediums wurde das Ablösen der Zellen gestoppt. Die nun gelösten Zellen wurden bei 140 xg für 3 min zentrifugiert und anschließend in 1 mL des jeweiligen Mediums resuspendiert und in neue T25-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt (2 % der resuspendierten Zellen für MEF, 20 % für SW620).

4.1.4 Probenvorbereitung

Für alle mikroskopischen Analysen wurden die Zellen auf sterile Deckgläser ausgesät. Die Sterilität wurde durch Tränken der Deckgläser in 100 % Ethanol (unvergällt, um Verunreinigungen zu minimieren) und anschließendem Abflammen sichergestellt. Für jede Probe wurden zwischen 8-15 µL der in 4.1.3 beschriebenen resuspendierten Zellpassage ausgesät und vor dem jeweiligen Experiment für mindestens 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine vollständige

Adhäsion und Adaption zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren Y11 und Y15 sind spezifische Inhibitoren für die Kinasedomäne der FAK; im Detail verhindern sie die Autophosphorylierung des Tyrosin 397. Die gewählten Konzentrationen werden beim jeweiligen Versuch beschrieben, grundsätzlich wurde ein Vielfaches der in früheren Arbeiten von Golubovskaya et al. ermittelten IC_{50} -Werte verwendet. Für den Inhibitor Y11 liegt dieser Wert bei 50 nM, bei Y15 wurde ein IC_{50} -Wert von 1 μ M ermittelt [58, 62]. Die Multiplikatoren in der hier verwendeten Arbeit liegen bei 1x, 5x, 10x und 50x.

4.2 Färbungen und Markierungen

4.2.1 Antikörpermarkierungen

Vor der eigentlichen Immunmarkierung wurden die Zellen mit 4 % (w/v) PFA und 0.2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS für 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und mit 0.2 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Abschließend wurden die Coverslips 3x für 5 min mit PBS gewaschen.

Vor jeder Färbung mit dem jeweiligen Antikörper wurden die Zellen für 30 min bei RT mit 1 % (w/v) BSA in PBS geblockt. Für konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden die Antikörper 1:200 (1. Antikörper) und 1:500 (2. Antikörper) in 1 % (w/v) BSA in PBS verdünnt. Für die Einzelmolekülmikroskopie wurde ausschließlich der primäre Antikörper p-FAK (Tyr 397) mit der Lotnummer: K1015 in einer Verdünnung von 1:5000 in 1 % (w/v) BSA in PBS verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde der *Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 647* in einer Verdünnung von 1:10000 in 1 % (w/v) BSA in PBS verwendet. Die Zellen wurden jeweils über Nacht bei 4 °C gefärbt und nach jedem Antikörper wurden die Proben erneut 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Die vorbereiteten Proben können bei 4 °C in PBS gelagert werden. Dieses Färbeprotokoll basiert auf Babel et al. [50].

4.2.2 Calcein- & Hoechst-Färbung

Für die Lebendzellfärbungen wurden die Proben nach der entsprechenden Behandlung mit den Inhibitoren (beschrieben in den jeweiligen Versuchen) mit einer Endkonzentration von 2 μ M Calcein im entsprechenden Medium (siehe Kapitel 4.1) für 30 min. bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch PBS mit 5 μ g/mL Hoechst ersetzt. Nach 5-minütiger Färbung bei 37 °C wurde die Färbelösung entfernt und durch PBS ersetzt, um die Aufnahmen zu starten. Für alle Lebendzellfärbungen wurde ein Objektiv mit 4-facher Vergrößerung gewählt, um möglichst viele Zellen gleichzeitig messen zu können. Dies erhöht nicht nur

die Statistik, es verringert auch die Zeit der Messungen, in der die lebenden Zellen durch die Färbungen oder sonstigen Behandlungen reagieren können. Daher wurden die Proben innerhalb von 10 Minuten gemessen.

4.3 Einzelmolekülmikroskopie

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroskopie-Aufbau ist eine Eigenkonstruktion der Arbeitsgruppe Meckel, FB10 Biologie, TU-Darmstadt. Der Aufbau beinhaltet vier Laser mit den Anregungswellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm und 647 nm. Die durch dichromatische Spiegel in einen gemeinsamen Strahlengang gelenkten Laser können einzeln durch einen *Acousto-optic tunable filter* (AOTF) in den nachgeschalteten *beam expander* eingekoppelt werden. Bevor der jeweilige Laser in das eigentliche Mikroskop gelangt, wird der Strahlengang noch über eine zwei-Spiegel-Ablenkung geführt, welche eine parallel verschobene Einkopplung des Lasers in das Mikroskop, und somit die verwendete Mikroskopietechnik TIRF [91] ermöglicht.

4.3.1 TIRF & PALM

Die Mikroskopietechnik TIRF wurde verwendet, um die adhärennten Bereiche der Membran auf der Unterseite einer Zellen zu messen und um eine hohe Auflösung, dank geringerer Anregung von Fluorophoren, welche sich nicht im Fokus befinden, zu ermöglichen. In Kombination mit PALM [92, 93] konnte eine zusätzlich höhere Auflösung, die unterhalb der Beugungsbegrenzung liegt, erreicht werden, was letztendlich die Einzelmolekülmikroskopie ermöglicht.

Insgesamt wurden pro Zelle 2000 Bilder unmittelbar hintereinander aufgenommen, um das durch PALM begünstigte Blinken der Fluorophore möglichst oft zu erfassen. Die Fähigkeit von Fluorophoren, wie die hier verwendeten Alexa-Farbstoffe, zu blinken, wird durch einen stochastischen Wechsel zwischen *on-state* und *off-state* der Fluorophore bedingt. Das in Abbildung 32 vereinfachte Jablonski-Diagramm zeigt die Anregung der Moleküle und die damit verbundene Anhebung auf ein höheres Energieniveau [94, 95]. Von diesem Zustand aus können Fluorophore zurück in den Grundzustand gelangen, indem sie die Energie in Form von Fluoreszenz abgeben, oder aber ohne Emission über einen *off-state* im angeregten Triplett-zustand (T1). Durch die regelmäßige Anregung mittels UV werden die längeren Dunkelzustände (D) ebenfalls in den Grundzustand, und somit in den *on-state*, überführt.

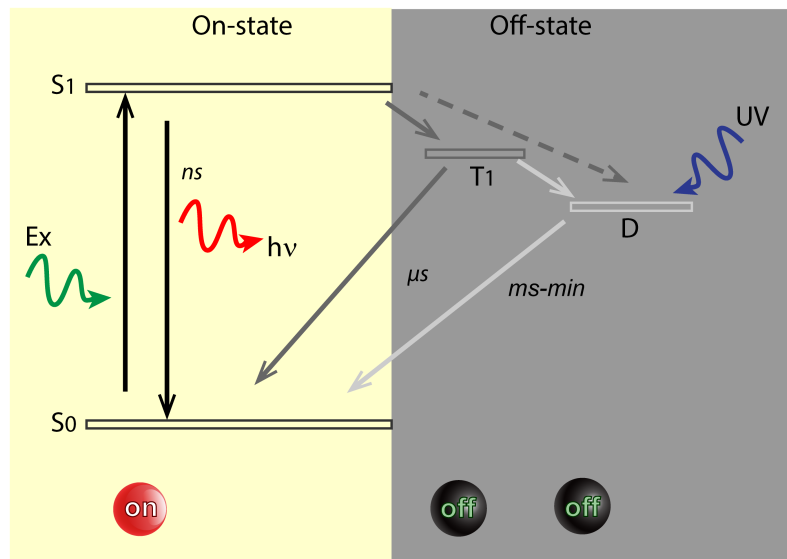


Abbildung 32: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Darstellung der *on-states* und *off-states* von Fluorophoren. Ein Fluorophor kann durch Anregung (grüner Pfeil, Ex) vom Grundzustand in einen höheren Energiezustand überführt werden. Von dort kann es durch Emission von Fluoreszenz zurück in den Grundzustand gelangen (roter Pfeil). Eine weitere Möglichkeit ist die emissionslose Überführung in einen dunklen *off-state*. Hierdurch kann der Fluorophor ohne Fluoreszenz in den Grundzustand zurück gelangen oder in einem permanenten Dunkelzustand übergehen. Um diesen Zustand aufzuheben, kann eine Anregung mittels UV genutzt werden.
Quelle des Bildes: Nahidiazar et al. 2016 [94]

Um die Blinkeigenschaften der verwendeten Fluorophore zu stabilisieren, wurde ein STORM-Puffer während der Messung verwendet. Dieser Puffer verringert die Oxidationsrate der im Dunkelzustand befindlichen Farbstoffe und begünstigt somit weiter die Rückkehr der Farbstoffe in den *on-state*.

Enzym-Stock:	Glukose-Stock:
0.2 %(v/v) Catalase	10 %(w/v) Glukose
0.4 %(v/v) TCEP (1M)	10 %(v/v) Glycerin
50 %(v/v) Glycerin	in ddH ₂ O
45 %(v/v) ddH ₂ O	
2.5 %(v/v) KCl (1M)	
2 %(v/v) Tris-HCl pH 7.5 (1M)	
0.1 %(w/v) Glukose Oxidase	

Die beiden Stock-Lösungen können bei -20 °C gelagert werden. Alle Messungen wurden in 400 μ L Glukose-Stock mit 50 μ L des Enzym-Stocks und 50 μ L 1M Ethanolamin durchgeführt. Nach Queensland Brain Institut.

(<https://web.qbi.uq.edu.au/microscopy/dstorm-buffer/>, Stand: 21.09.2017).

4.3.2 FIJI & ThunderSTORM

Zur Auswertung der zuvor aufgenommenen 2000 Bilder wurde das FIJI [96] *plugin* ThunderSTORM [97] verwendet.

Dieses *plugin* ermöglicht es, die blinkenden Signale der Fluorophore als Positionsdaten zu erfassen. Zur besseren Veranschaulichung ist in Abbildung 33 ein Einzelbild eines Zellausschnittes, der optische Mittelwert der aufgenommenen 2000 Bilder, und das 2D *average shifted* Histogramm der ThunderSTORM Auswertung dieses Ausschnitts zu sehen (A-C = MEF, D-F = SW620). In (C) bzw. (F) wurden die ermittelten Positionsdaten also für den Benutzer nur noch einmal als 2D-Histogramm dargestellt.

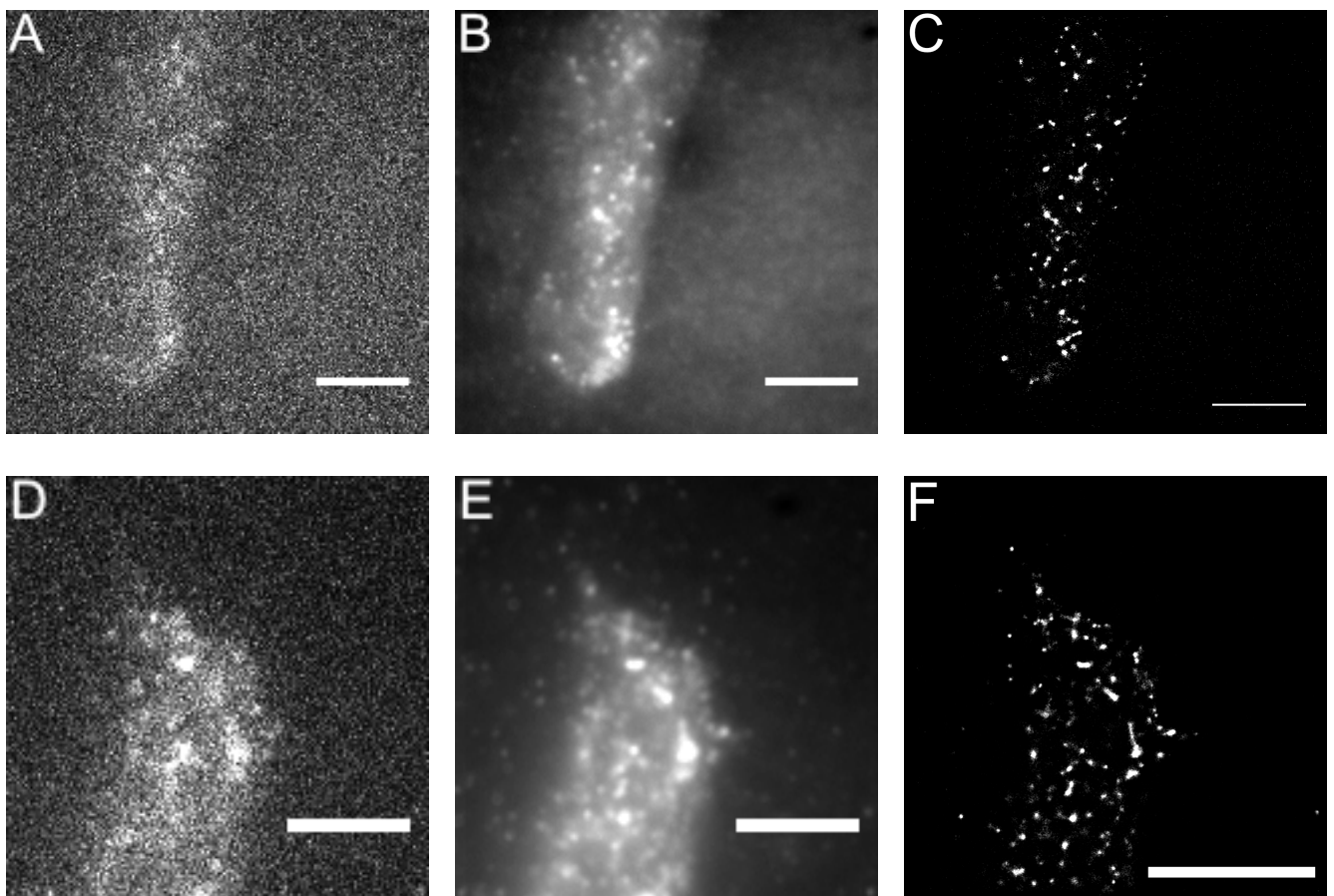


Abbildung 33: Ein einzelnes Bild des 2000 Bilder großen Stapels der Rohdaten, der optische Mittelwert des Stapels und die ThunderSTORM Projektion des Stapels (A-C = MEF, D-F = SW620).
Größenbalken = 5 μm

Als ersten Selektionsfilter der Positionsdaten wurde ein Mindestabstand zwischen einzelnen blinkenden Fluorophoren von 20 nm gewählt. Signale unterhalb dieser Grenze werden zusammengefasst und als ein einzelnes Signal gezählt. Grund hierfür ist, dass zwei gebundene und konjugierte Antikörper einen ungefähren Durchmesser von 20 nm einnehmen und somit verhindert wird, dass derselbe Fluorophor, oder zwei Fluorophore an einem primären Antikör-

per, als zwei Signale detektiert werden, da nicht die Fluorophore, sondern die pFAK-Moleküle gezählt werden sollen.

Der nächste Selektionsfilter wurde aufgrund der Größe der Normalverteilung der detektierten Signale gewählt, um lediglich die relevanten Helligkeitsverteilungen aufzunehmen. Die aufgenommenen fokalen Adhäsionen einer Zelle wurden dann in $16 \mu\text{m}^2$ ROI aufgeteilt (2-3 pro Aufnahme) und die durch das *plugin* ThunderSTORM detektierten Signale, inklusive Koordinaten gespeichert, um diese weiter analysieren und auswerten zu können. Die weitere Analyse basiert daher ausschließlich auf den ermittelten Positionsdaten. Es handelt sich ab diesem Schritt nicht mehr um eine Bild-, sondern um eine statistische Analyse.

4.4 Clusteranalyse

Die aus dem *plugin* ThunderSTORM exportierten Daten wurden mittels DB-SCAN [98, 99] oder HDB-SCAN [100], mit oder ohne vorheriger *heatmap*, analysiert. Für die *heatmap* wurden 500 Unterscheidungen in der Dichte berücksichtigt. Als *threshold* für die Erstellung der binären Dichtemaske wurde 1.6×10^{-7} gewählt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Analysen mittels HDB-SCAN mit vorangehender Elimination des Hintergrundes durch die Dichtemaske durchgeführt. Für die Clusteranalyse wurde die Mindestanzahl an Signalen pro Cluster auf 20 festgesetzt. Unterhalb dieser Grenze wurden keine Cluster berücksichtigt.

4.5 Statistische Auswertung

Die gesamte statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm R [101], genauer RStudio [102, 103] durchgeführt. Die zusätzlich verwendeten Pakete sind dbscan [104], SMoLR [105], tictoc [106], MASS [107], spatstat [108], signal [109], ggplot2 [110], viridis [111] und cowplot [112].

Für die statistische Auswertung der Einzelmoleküldaten wurden diese aufgrund ihrer rechtsschiefen Verteilung logarithmisch transformiert. Abschließend wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt, um die Signifikanz der Messungen zu ermitteln. Die Legende der Signifikanz wurde wie folgt festgelegt: $p\text{-value} < 0.05 = *$, $p\text{-value} < 0.01 = **$, $p\text{-value} < 0.001 = ***$

4.6 Materialien

Material	Bezugsquelle
PBS, BSA, FCS, Trypsin, EDTA, Katalase, Glukose Oxidase, TCEP, Leibovitz's L-15	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Lipofectamin 2000, PBS, Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 647 Lot: 1693297 Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PFA	Merck Schuchardt oHG, Hohenbrunn, Deutschland
p-FAK (Tyr 397) Lot: K1015	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Festkörperlaser des Mikroskopieaufbaus	Coherent Inc., Santa Clara, USA
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calcein Red TM AM Lot:158116	AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, California, USA
Glutaraldehyd Lot:P100292	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Literatur

- [1] S Sun, H Wu, and J Guan. Nuclear FAK and its kinase activity regulate VEGFR2 transcription in angiogenesis of adult mice. *Sci. Rep.*, 8(1):2550, February 2018.
- [2] A Levitzki and A Gazit. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267(5205):1782–1788, March 1995.
- [3] S F Retta, F Balzac, P Ferraris, A M Belkin, R Fässler, M J Humphries, G De Leo, L Silengo, and G Tarone. β 1-Integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function. *MBoC*, 9(4):715–731, April 1998.
- [4] F Balzac, A M Belkin, V E Koteliansky, Y V Balabanov, F Altruda, L Silengo, and G Tarone. Expression and functional analysis of a cytoplasmic domain variant of the beta 1 integrin subunit. *J. Cell Biol.*, 121(1):171–178, April 1993.
- [5] T A Sovershaev, D Unruh, B Sveinbjörnsson, J T Fallon, J B Hansen, V Y Bogdanov, and M A Sovershaev. A novel role of bone morphogenetic protein-7 in the regulation of adhesion and migration of human monocytic cells. *Thromb. Res.*, 147:24–31, November 2016.
- [6] C W Brown, A S Brodsky, and R N Freiman. Notch3 overexpression promotes anoikis resistance in epithelial ovarian cancer via upregulation of COL4A2. *Mol. Cancer Res.*, 13(1):78–85, January 2015.
- [7] G Kadaré, M Toutant, E Formstecher, J Corvol, M Carnaud, M Bouterin, and J Girault. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 278(48):47434–47440, November 2003.
- [8] D Ilić, Y Furuta, S Kanazawa, N Takeda, K Sobue, N Nakatsuji, S Nomura, J Fujimoto, M Okada, and T Yamamoto. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549):539–544, October 1995.
- [9] J L Guan and D Shalloway. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*, 358(6388):690–692, August 1992.
- [10] D A Lauffenburger and A F Horwitz. Cell migration: A physically integrated molecular process, 1996.
- [11] S Abbi, H Ueda, C Zheng, L A Cooper, J Zhao, R Christopher, and J Guan. Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol. Biol. Cell*, 13(9):3178–3191, September 2002.

-
- [12] X Zhao, Y Cheng, M Liang Cheng, L Yu, M Mu, H Li, Y Liu, B Zhang, Y Yao, H Guo, R Wang, and Q Zhang. Focal adhesion kinase regulates fibroblast migration via integrin beta-1 and plays a central role in fibrosis. *Sci. Rep.*, 6:19276, January 2016.
- [13] D J Webb, K Donais, L A Whitmore, S M Thomas, C E Turner, J T Parsons, and A F Horwitz. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.*, 6(2):154–161, February 2004.
- [14] F G Giancotti and E Ruoslahti. Integrin signaling. *Science*, 285(5430):1028–1032, August 1999.
- [15] M Nagano, D Hoshino, N Koshikawa, T Akizawa, and M Seiki. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.*, 2012, January 2012.
- [16] Samantha J Stehbens and Torsten Wittmann. Analysis of focal adhesion turnover: a quantitative live-cell imaging example. *Methods Cell Biol.*, 123:335–346, 2014.
- [17] H Yano, Y Mazaki, K Kurokawa, S K Hanks, and others. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell–cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 2004.
- [18] E Avizienyte and M C Frame. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17(5):542–547, October 2005.
- [19] A van der Flier and A Sonnenberg. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.*, 305(3):285–298, September 2001.
- [20] T T Puck and P I Marcus. A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE: THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 41(7):432–437, July 1955.
- [21] F M Lauer, E Kaemmerer, and T Meckel. Single molecule microscopy in 3D cell cultures and tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 79-80:79–94, December 2014.
- [22] S Huveneers and E H J Danen. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, src and rho. *J. Cell Sci.*, 122(Pt 8):1059–1069, April 2009.
- [23] M P Playford and M D Schaller. The interplay between src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*, 23(48):7928–7946, October 2004.
- [24] M A Arnaout, S L Goodman, and J Xiong. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19(5):495–507, October 2007.

-
- [25] B Luo, C V Carman, and T A Springer. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 25:619–647, 2007.
- [26] J W Tamkun, D W DeSimone, D Fonda, R S Patel, C Buck, A F Horwitz, and R O Hynes. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46(2):271–282, July 1986.
- [27] R O Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, September 2002.
- [28] Iain D Campbell and Martin J Humphries. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3(3), March 2011.
- [29] M D Schaller and J T Parsons. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6(5):705–710, October 1994.
- [30] R Zaidel-Bar, S Itzkovitz, A Ma’ayan, R Iyengar, and B Geiger. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.*, 9(8):858–867, August 2007.
- [31] D D Schlaepfer, M A Broome, and T Hunter. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-src complex: involvement of the grb2, p130cas, and nck adaptor proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 17(3):1702–1713, March 1997.
- [32] Ning Wang. Cellular adhesion: Instant integrin mechanosensing. *Nat. Mater.*, 16(12):1173–1174, November 2017.
- [33] M D Schaller, J D Hildebrand, J D Shannon, J W Fox, R R Vines, and J T Parsons. Auto-phosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.*, 14(3):1680–1688, March 1994.
- [34] S B Kanner, A B Reynolds, R R Vines, and J T Parsons. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(9):3328–3332, May 1990.
- [35] M D Schaller. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1540(1):1–21, July 2001.
- [36] G S Whitney, P Chan, J Blake, W L Cosand, M G Neubauer, A Aruffo, and S B Kanner. Human T and B lymphocytes express a structurally conserved focal adhesion kinase, pp125FAK, 1993.
- [37] S K Hanks, M B Calalb, M C Harper, and S K Patel. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(18):8487–8491, September 1992.

-
- [38] M D Schaller, C A Borgman, B S Cobb, R R Vines, A B Reynolds, and J T Parsons. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(11):5192–5196, June 1992.
- [39] M D Hens and D W DeSimone. Molecular analysis and developmental expression of the focal adhesion kinase pp125FAK in xenopus laevis. *Dev. Biol.*, 170(2):274–288, August 1995.
- [40] D D Schlaepfer, C R Hauck, and D J Sieg. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71(3-4):435–478, 1999.
- [41] S K Hanks, A M Quinn, and T Hunter. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861):42–52, July 1988.
- [42] S K Mitra, D A Hanson, and D D Schlaepfer. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(1):56–68, January 2005.
- [43] S K Hanks, L Ryzhova, N Shin, and J Brábek. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front. Biosci.*, 8:d982–96, May 2003.
- [44] V M Golubovskaya and W G Cance. FAK and p53 protein interactions. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 11(7):617–619, September 2011.
- [45] E G Kleinschmidt and D D Schlaepfer. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 45:24–30, April 2017.
- [46] S Lim, X L Chen, Y Lim, D A Hanson, T Vo, K Howerton, N Larocque, S J Fisher, D D Schlaepfer, and D Ilic. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol. Cell*, 29(1):9–22, January 2008.
- [47] D A Conner. Mouse embryo fibroblast (MEF) feeder cell preparation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, Chapter 23:Unit 23.2, May 2001.
- [48] G J Todaro and H Green. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*, 17:299–313, May 1963.
- [49] L Babel, L Kruse, S Bump, M Langhans, and T Meckel. Lipid-rafts remain stable even after ionizing radiation induced disintegration of $\beta 1$ integrin containing focal adhesions. *BMC Res. Notes*, 10(1):697, December 2017.
- [50] L Babel, M Grunewald, R Lehn, M Langhans, and T Meckel. Direct evidence for cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR) on the level of individual integrin $\beta 1$ clusters. *Sci. Rep.*, 7(1):3393, June 2017.
-

-
- [51] W B Gabriel, C Dukes, and H J R Bussey. Lymphatic spread in cancer of the rectum, 1935.
- [52] A Leibovitz, W C Wright, S Pathak, M J Siciliano, W P Daniels, H Fogh, and J Fogh. Detection and analysis of a glucose 6-phosphate dehydrogenase phenotype B cell line contamination. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63(3):635–645, September 1979.
- [53] K S Crump. A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4(5):854–871, October 1984.
- [54] W Farland and M Dourson. Noncancer health endpoints: approaches to quantitative risk assessment. In *Comparative environmental risk assessment*, pages 87–106. CRC Press, 2018.
- [55] B K Kobilka. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(4):794–807, April 2007.
- [56] J Seong, M Ouyang, T Kim, J Sun, P Wen, S Lu, Y Zhuo, N M Llewellyn, D D Schlaepfer, J Guan, S Chien, and Y Wang. Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Commun.*, 2:406, July 2011.
- [57] P A Janmey and C A McCulloch. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9:1–34, 2007.
- [58] V M Golubovskaya, C Nyberg, M Zheng, F Kweh, A Magis, D Ostrov, and W G Cance. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J. Med. Chem.*, 51(23):7405–7416, December 2008.
- [59] E A Beierle, X Ma, J Stewart, C Nyberg, A Trujillo, W G Cance, and V M Golubovskaya. Inhibition of focal adhesion kinase decreases tumor growth in human neuroblastoma. *Cell Cycle*, 9(5):1005–1015, March 2010.
- [60] R J Saphirstein, Y Z Gao, M H Jensen, C M Gallant, S Vetterkind, J R Moore, and K G Morgan. The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PLoS One*, 8(4):e62461, April 2013.
- [61] J T Parsons, J Slack-Davis, R Tilghman, and W G Roberts. Focal adhesion kinase: targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.*, 14(3):627–632, February 2008.
- [62] V M Golubovskaya, S Figel, B T Ho, C P Johnson, M Yemma, G Huang, M Zheng, C Nyberg, A Magis, D A Ostrov, I H Gelman, and W G Cance. A small molecule focal

-
- adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. *Carcinogenesis*, 33(5):1004–1013, May 2012.
- [63] Dorian Fabbro and Frank McCormick. *Protein Tyrosine Kinases: From Inhibitors to Useful Drugs*. Springer Science & Business Media, November 2007.
- [64] P Reichardt. Tyrosine kinase inhibitors for gastrointestinal stromal tumor, 2012.
- [65] L McInnes, J Healy, and S Astels. hdbscan: Hierarchical density based clustering. *The Journal of Open Source Software*, 2(11), mar 2017.
- [66] E Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie*, 9(1):413–468, December 1873.
- [67] M Agochiya, V G Brunton, D W Owens, E K Parkinson, C Paraskeva, W N Keith, and M C Frame. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene*, 18(41):5646–5653, October 1999.
- [68] V M Golubovskaya. Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Front. Biosci.*, 19:687–706, January 2014.
- [69] P Traxler. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures, 2003.
- [70] M Pearson, C García-Echeverría, and D Fabbro. Protein tyrosine kinases as targets for cancer and other indications, 2006.
- [71] M Debiec-Rychter and S Bauer. Other tyrosine kinase inhibitors in clinical trials, 2012.
- [72] N R Tasker, E J Rastelli, J C Burnett, E R Sharlow, J S Lazo, and P Wipf. Tapping the therapeutic potential of protein tyrosine phosphatase 4A with small molecule inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, June 2019.
- [73] W G Cance and V M Golubovskaya. Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? *Sci. Signal.*, 1(20):e22, May 2008.
- [74] V M Golubovskaya and W G Cance. Targeting the p53 pathway. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 22(4):747–764, October 2013.
- [75] V M Golubovskaya, K Conway-Dorsey, S N Edmiston, C Tse, A A Lark, C A Livasy, D Moore, R C Millikan, and W G Cance. FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 125(7):1735–1738, October 2009.
- [76] V M Golubovskaya and W G Cance. Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells. *Int. Rev. Cytol.*, 263:103–153, 2007.
-

-
- [77] T B Deramaudt, D Dujardin, A Hamadi, F Noulet, K Kolli, J De Mey, K Takeda, and P Rondé. FAK phosphorylation at tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol. Biol. Cell*, 22(7):964–975, April 2011.
- [78] Q Yang, C Jiang, T Jin, J Xu, T Qu, Y Guo, and Z Zhao. Synthesis of novel tetrandrine derivatives and their inhibition against NSCLC A549 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 20(11):1064–1074, November 2018.
- [79] R H Gunby, E Sala, C J Tartari, M Puttini, C Gambacorti-Passerini, and L Mologni. Oncogenic fusion tyrosine kinases as molecular targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 7(6):594–611, November 2007.
- [80] N Panera, A Crudele, I Romito, D Gnani, and A Alisi. Focal adhesion kinase: Insight into molecular roles and functions in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(1):99, January 2017.
- [81] S N Hochwald, C Nyberg, M Zheng, D Zheng, C Wood, N A Massoll, A Magis, D Ostrov, W G Cance, and V M Golubovskaya. A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell Cycle*, 8(15):2435–2443, August 2009.
- [82] D D Schlaepfer, S K Mitra, and D Ilic. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1692(2-3):77–102, July 2004.
- [83] S Wang, J R Moffitt, G T Dempsey, X Sunney Xie, and X Zhuang. Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(23):8452–8457, June 2014.
- [84] K A Lukyanov, D M Chudakov, S Lukyanov, and V V Verkhusha. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(11):885–890, November 2005.
- [85] M Andresen, A C Stiel, S Trowitzsch, G Weber, C Eggeling, M C Wahl, S W Hell, and S Jakobs. Structural basis for reversible photoswitching in dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(32):13005–13009, August 2007.
- [86] M A Hamburg and F S Collins. The path to personalized medicine. *N. Engl. J. Med.*, 363(4):301–304, July 2010.
- [87] M Whirl-Carrillo, E M McDonagh, J M Hebert, L Gong, K Sangkuhl, C F Thorn, R B Altman, and T E Klein. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4):414–417, 2012.
- [88] R Mirnezami, J Nicholson, and A Darzi. Preparing for precision medicine. *N. Engl. J. Med.*, 366(6):489–491, February 2012.

-
- [89] F S Collins and H Varmus. A new initiative on precision medicine. *N. Engl. J. Med.*, 372(9):793–795, February 2015.
- [90] V M Golubovskaya, F A Kweh, and W G Cance. Focal adhesion kinase and cancer. *Histol. Histopathol.*, 24(4):503–510, April 2009.
- [91] N L Thompson, T P Burghardt, and D Axelrod. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 33(3):435–454, March 1981.
- [92] S T Hess, T P K Girirajan, and M D Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.*, 91(11):4258–4272, December 2006.
- [93] E Betzig, G H Patterson, R Sougrat, O W Lindwasser, S Olenych, J S Bonifacino, M W Davidson, J Lippincott-Schwartz, and H F Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, September 2006.
- [94] L Nahidiazar, A V Agronskaia, J Broertjes, B van den Broek, and K Jalink. Optimizing imaging conditions for demanding Multi-Color super resolution localization microscopy. *PLoS One*, 11(7):e0158884, July 2016.
- [95] A Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131(3319):839–840, June 1933.
- [96] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, J Tinevez, D J White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomanac, and A Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7):676–682, June 2012.
- [97] M Ovesný, P Křížek, J Borkovec, Z Svindrych, and G M Hagen. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics*, 30(16):2389–2390, August 2014.
- [98] M Ester, H Kriegel, J Sander, X Xu, and Others. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In *Kdd*, volume 96, pages 226–231, 1996.
- [99] R J G B Campello, D Moulavi, and J Sander. Density-Based clustering based on hierarchical density estimates. In *Advances in Knowledge Discovery and Data Mining*, pages 160–172. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [100] R J G B Campello, D Moulavi, A Zimek, and J Sander. Hierarchical density estimates for data clustering, visualization, and outlier detection, 2015.
- [101] R Core Team and Others. R: A language and environment for statistical computing. 2013.

-
- [102] Rstudio Team and Others. RStudio: integrated development for R. *RStudio, Inc. , Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>*, 42:14, 2015.
- [103] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.
- [104] M Hahsler and M Piekenbrock. *dbscan: Density Based Clustering of Applications with Noise (DBSCAN) and Related Algorithms*. R package version 1.1-3.
- [105] Optical Imaging Centre ErasmusMC Rotterdam. *SMoLR: Single Molecule Localization Microscopy visualization and analysis in R*. R package version 1.0.3.
- [106] S Izrailev. *tictoc: Functions for timing R scripts, as well as implementations of Stack and List structures*. R package version 1.0.
- [107] W N Venables and B D Ripley. *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York, fourth edition. ISBN 0-387-95457-0.
- [108] A Baddeley and R Turner. *spatstat: AnRPackage for analyzing spatial point patterns*, 2005.
- [109] signal developers. *signal: Signal processing*.
- [110] H Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- [111] S Garnier. *viridis: Default Color Maps from 'matplotlib'*, 2018. R package version 0.5.1.
- [112] C O Wilke. *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'*, 2019. R package version 0.9.4.

5 Anhang

5.1 Simulationsskript

```
for(j in 1:10){
# CLUSTER SIMULATION
A = 4000                      # plot area
N = sample(2:10, 1)          # number of clusters
B = sample(250:600, 1)       # background spots

# cluster centers
ccX = runif(N, min = 0, max = A)
ccY = runif(N, min = 0, max = A)

# spots per cluster
spotsX <- NULL
spotsY <- NULL
detectionsC <- NULL

for (i in 1:N) {
  n = sample(10:300, 1)      # spots per cluster
  s1 = sample(50:150, 1)    # spread x dimension
  s2 = sample(50:150, 1)    # spread y dimension
  theta= sample(0:360,1)    # rotation angle

  spotsXt1 = rnorm(n * i, ccX[i], s1)
  spotsYt1 = rnorm(n * i, ccY[i], s2)

  spotsXt2 = ((spotsXt1-ccX[i])*cos(theta)-(spotsYt1-ccY[i])*sin(theta))+
    ↪ ccX[i]
  spotsYt2 = ((spotsXt1-ccX[i])*sin(theta)+(spotsYt1-ccY[i])*cos(theta))+
    ↪ ccY[i]

  spotsX <- rbind(spotsX, matrix(nrow = length(spotsXt2), ncol = 1,
    ↪ spotsXt2))
  spotsY <- rbind(spotsY, matrix(nrow = length(spotsXt2), ncol = 1,
    ↪ spotsYt2))
  detectionsC <- rbind(detectionsC, matrix(nrow = length(spotsXt2), ncol =
    ↪ 1, i))
}
```

```

}

# background spots
backgroundX = runif(B, min = 0, max = A)
backgroundY = runif(B, min = 0, max = A)

# combine all in one vector
detectionsX = c(spotsX, backgroundX)
detectionsY = c(spotsY, backgroundY)
detectionsC <- append(detectionsC, matrix(nrow = length(backgroundX), ncol
  ↳ = 1, 0))
detections = cbind(detectionsX, detectionsY, detectionsC)
detections1 <- cbind(as.integer(1:length(detectionsX)), 1, detectionsX,
  ↳ detectionsY, 1, 1, 1, 1, 1, 0)
colnames(detections1) <- c("id", "frame", "x..nm.", "y..nm.", "sigma..nm.",
  ↳ "intensity..photon.", "offset..photon.", "bkgstd..photon.", "chi2",
  ↳ "uncertainty..nm.")

# plot
Tmp <- paste(getwd(), "/sim/", "Sim-", A, "-", N, "-", n, "-", s1, "-", s2,
  ↳ "-", B, ".png", sep = "")
png(Tmp)
par(pty = "s")
plot(detections[, 1], detections[, 2], xlim = c(0, A), ylim = c(0, A), asp
  ↳ = 1, pch = 20, main=paste("N=␣", N), xlab="", ylab="")
dev.off()

# save csv
Tmp <- paste(getwd(), "/sim/", "Sim-", A, "-", N, "-", n, "-", s1, "-", s2,
  ↳ "-", B, ".csv", sep = "")
write.table(detections1, file = Tmp, sep = ",", row.names = FALSE)

Tmp <-paste(getwd(), "/sim/", "Sim-", A, "-", N, "-", n, "-", s1, "-", s2,
  ↳ "-", B, "-Control", ".csv", sep = "")
write.table(detections, file = Tmp, sep = ",", row.names = FALSE)
}

```

5.2 Clusteranalyse

```
##### dependencies #####
library(tictoc)
library(tcltk)
library(MASS)
library(spatstat)
library(signal)
library(ggplot2)
library(viridis)
library(SMoLR)
library(cowplot)
library(stats)
library(dbscan)

source("R/step_hdbscan.R")
source("R/step_dbscan.R")
source("R/step_ripley.R")
source("R/step_threshold.R")
source("R/step_kmeans.R")

##### plot & save? #####
DoPrint <- TRUE # save plots as .png
SingleFilePlot <- TRUE # save plots as one .png (TRUE) or as separate files
  ↳ (FALSE). Only used if DoPrint = TRUE

DoSave <- FALSE # save workspace as .RData File

##### parameters #####
# DB Scan
Eps <- 83 # max distance between points; 83 for MEF and SW620
Mpts <- 17 # min number of points; MEF: 17, SW620: 50

# HDB Scan
Pts <- 20 # min number of points

# Heatmap
Hmbs <- 500 #number of bins
Hmbw <- 400 #kde bandwidth
```

```

Thresh <- 1.6e-07 #Threshold for bw bitmap

#### get path & start loop ####
Path <- tk_choose_dir(getwd())
tic()
print("Starting")
flush.console()
Filelist <- list.files(path = Path, pattern = "\\*.csv$", ignore.case = TRUE
  ↪ )
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAll.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAll1.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAllDB.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAllDBM.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAllHDB.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "singledataAllHDBM.csv"]
Filelist <- Filelist[Filelist != "Clusternumber.csv"]
Filelist <- sort(Filelist)

print(paste("Found", length(Filelist), " file(s)", sep = "_"))
flush.console()

SingleClusterDataAllDB <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 7))
SingleClusterDataAllDBM <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 7))
SingleClusterDataAllHDB <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 7))
SingleClusterDataAllHDBM <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 7))
Clusternumber <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 5))

for (j in 1:length(Filelist)) {
  tic()
  #### get csv ####
  File<-list()
  File$Fullpath <- paste(Path, Filelist[j], sep = "/")
  File$Name <- basename(File$Fullpath)
  File$Savefile <- gsub('.{4}$', '', File$Name)
  File$Path<-Path

  Csv <- read.csv(File$Fullpath)
  Pattern <- ppp(Csv[, 3], Csv[, 4], c(min(Csv[, 3]), max(Csv[, 3])),
    ↪ c(min(Csv[, 4]), max(Csv[, 4])), unitname = c("nm", "nm"))

```

```

##### threshold #####
Masked <- step_threshold(Csv, Hmbs, Hmbw, Thresh)
PatternM <- ppp(Csv[, 3], Csv[, 4], c(min(Csv[, 3]), max(Csv[, 3]))
  ↳ , c(min(Csv[, 4]), max(Csv[, 4])), unitname = c("nm", "nm"),
  ↳ window = Masked$Mask)
CsvM <- subset(Csv, x..nm. %in% PatternM$x & y..nm. %in% PatternM$y
  ↳ )

##### k statistics #####
Ripleys<-step_ripley(Pattern)

##### DB Scan #####
DbInp <- data.frame(Csv$x..nm., Csv$y..nm., Csv[ncol(Csv)], Csv$
  ↳ frame, "1")
colnames(DbInp) <- c("X", "Y", "Precision", "First_Frame", "Channel
  ↳ ")
DbInp$Channel <- as.double(1)
DbScan<-step_dbscan(DbInp, Eps, Mpts)

##### DB Scan Masked #####
DbInpM <- data.frame(CsvM$x..nm., CsvM$y..nm., CsvM[ncol(CsvM)], CsvM
  ↳ $frame, "1")
colnames(DbInpM) <- c("X", "Y", "Precision", "First_Frame", "
  ↳ Channel")
DbInpM$Channel <- as.double(1)
DbScanM<-step_dbscan(DbInpM, Eps, Mpts)

##### HDB Scan #####
Hdbsinp <- cbind(Csv$x..nm., Csv$y..nm., Csv[ncol(Csv)])
HdbScan<-step_hdbscan(Hdbsinp, Pts)

HdbsinpM<-cbind(CsvM$x..nm., CsvM$y..nm., CsvM[ncol(CsvM)])
HdbScanM<-step_hdbscan(HdbsinpM, Pts)

##### plots #####
if (DoPrint==TRUE) {
  #scatterplot
  ScPlot<-ggplot(Csv, aes(x = Csv$x, y = Csv$y))+ geom_point(
    ↳ size = .4, shape = 16) + coord_fixed(ratio = 1)+ labs

```

```

→ (title = "raw_data", x = "", y = "")+theme_void() +
→ theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5))

```

#Scatterplot masked

```

ScPlotM<- ggplot(CsvM, aes(x = CsvM$x, y = CsvM$y))+ geom_
→ point(size = .4, shape = 16) + coord_fixed(ratio = 1)
→ + labs(title = "masked_raw_data", x = "", y = "")+
→ theme_void() + theme(plot.title = element_text(hjust
→ = 0.5))+xlim(Pattern$window$ xrange) + ylim(Pattern$
→ window$ yrange)

```

```

if (SingleFilePlot==TRUE){
  PlotList<-list(Masked$HmPlot, ScPlot, HdbScan$HdbPlot
→ , DbScan$DbPlot#, Ripleys$HPlot
, Masked$BmPlot, ScPlotM, HdbScanM$HdbPlot, DbScanM$
→ DbPlot)#, Kmeans$KmPlot)
  AllPlots<-plot_grid(plotlist=PlotList, ncol=4, labels
→ = "AUTO")
  Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-plots",
→ ".png", sep = "")
  ggsave(Tmp, plot = AllPlots, device = "png", width
→ = 35, height = 14)

```

} else {

```

  Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-scatter
→ ", ".png", sep = "")
  ggsave(Tmp, plot = ScPlot, device = "png", width =
→ 7, height = 7)

```

```

  Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-dbscan"
→ , "-", DbScan$DBScan$inputs$eps, "-", DbScan$
→ DBScan$inputs$MinPts, ".png", sep = "")
  ggsave(Tmp, plot = DbScan$DbPlot, device = "png",
→ width = 7, height = 7)

```

```

  Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-Hstat",
→ ".png", sep = "")
  ggsave(Tmp, plot = Ripleys$HPlot, device = "png",
→ width = 7, height = 7)

```



```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-heat",
  ↪ ".png", sep = "")
ggsave(Tmp, plot = Masked$HmPlot, device = "png",
  ↪ width = 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-dbscanM
  ↪ ", "-", DbScan$DBScan$inputs$eps, "-", DbScan
  ↪ $DBScan$inputs$MinPts, ".png", sep = "")
ggsave(Tmp, plot = DbScanM$DbPlot, device = "png",
  ↪ width = 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-
  ↪ scatterM", ".png", sep = "")
ggsave(Tmp, plot = ScPlotM, device = "png", width =
  ↪ 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-Mask", "-
  ↪ ", Hmbs, "-", Hmbw, "-", Thresh, ".png", sep="")
ggsave(Tmp, plot = Masked$BmPlot, device = "png",
  ↪ width = 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-KMeans",
  ↪ "-", length(Kmeans$KmData), ".png", sep="")
ggsave(Tmp, plot = Kmeans$KmPlot, device = "png",
  ↪ width = 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-HdbScan"
  ↪ ", "-", HdbScan$HdbScan$inputs$MinPts, ".png", sep
  ↪ = "")
ggsave(Tmp, plot = HdbScan$HdbPlot, device = "png",
  ↪ width = 7, height = 7)

```

```

Tmp <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, "-HdbScanM
  ↪ ", "-", HdbScanM$HdbScan$inputs$MinPts, ".png",
  ↪ sep="")
ggsave(Tmp, plot = HdbScanM$HdbPlot, device = "png"
  ↪ , width = 7, height = 7)

```

```

}
```

```

}
```

```

#### Save ####
if (DoSave==TRUE) {
    Savefile <- paste(File$Path, "/", File$Savefile, ".RData",
        ↪ sep = "")
    save.image(file = Savefile)
}

#### collect all data ####
Conz <- gsub('.*_(conz[0-9]+).*', '\\1', File$Name)
Conz <- gsub("conz", "", Conz)

Inhib <- gsub('.*_(Y[0-9]+).*', '\\1', File$Name)

#collect DB Scan
if (is.na(DbScan$DbCluster[1,1])==TRUE){
    ClusterDataDB<-data.frame( File$Name, Inhib, Conz, DbScan$
        ↪ DbCluster$cluster, DbScan$DbCluster$area, DbScan$
        ↪ DbCluster$N, DbScan$DbCluster$N)
    colnames(ClusterDataDB)<-c("File", "Inhibitor", "
        ↪ Concentration", "ClusterNumber", "Area", "DotsPerCluster
        ↪ ", "ClusterDensity")
} else {
    ClusterDataDB<-data.frame( File$Name, Inhib, Conz, DbScan$
        ↪ DbCluster$cluster, DbScan$DbCluster$area, DbScan$
        ↪ DbCluster$N, DbScan$DbCluster$N/DbScan$DbCluster$area)
    colnames(ClusterDataDB)<-c("File", "Inhibitor", "
        ↪ Concentration", "ClusterNumber", "Area", "DotsPerCluster
        ↪ ", "ClusterDensity")
}
SingleClusterDataAllDB<-rbind( SingleClusterDataAllDB, ClusterDataDB)

#collect masked DB Scan
if (is.na(DbScanM$DbCluster[1,1])==TRUE){
    ClusterDataDBM<-data.frame( File$Name, Inhib, Conz, DbScanM$
        ↪ DbCluster$cluster, DbScanM$DbCluster$area, DbScanM$
        ↪ DbCluster$N, DbScanM$DbCluster$N)
    colnames(ClusterDataDBM)<-c("File", "Inhibitor", "
        ↪ Concentration", "ClusterNumber", "Area", "DotsPerCluster
        ↪ ", "ClusterDensity")
} else {

```

```

ClusterDataDBM<-data.frame( File$Name, Inhib , Konz , DbScanM$
  ↳ DbCluster$cluster , DbScanM$DbCluster$area , DbScanM$
  ↳ DbCluster$N, DbScanM$DbCluster$N/DbScanM$DbCluster$
  ↳ area)
colnames(ClusterDataDBM)<-c(" File ", " Inhibitor ", "
  ↳ Concentration ", " ClusterNumber ", " Area ", " DotsPerCluster
  ↳ ", " ClusterDensity ")
}
SingleClusterDataAllDBM<-rbind( SingleClusterDataAllDBM ,
  ↳ ClusterDataDBM)

#collect HDB Scan
if (is.na(HdbScan$HdbCluster[1,1])==TRUE){
  ClusterDataHDB<-data.frame( File$Name, Inhib , Konz , HdbScan$
    ↳ HdbCluster$cluster , HdbScan$HdbCluster$area , HdbScan$
    ↳ HdbCluster$N, HdbScan$HdbCluster$N)
  colnames(ClusterDataHDB)<-c(" File ", " Inhibitor ", "
    ↳ Concentration ", " ClusterNumber ", " Area ", " DotsPerCluster
    ↳ ", " ClusterDensity ")
} else{
  ClusterDataHDB<-data.frame( File$Name, Inhib , Konz , HdbScan$
    ↳ HdbCluster$cluster , HdbScan$HdbCluster$area , HdbScan$
    ↳ HdbCluster$N, HdbScan$HdbCluster$N/HdbScan$HdbCluster$
    ↳ area)
  colnames(ClusterDataHDB)<-c(" File ", " Inhibitor ", "
    ↳ Concentration ", " ClusterNumber ", " Area ", " DotsPerCluster
    ↳ ", " ClusterDensity ")
}
SingleClusterDataAllHDB<-rbind( SingleClusterDataAllHDB ,
  ↳ ClusterDataHDB)

#collect masked HDB Scan
if (is.na(HdbScanM$HdbCluster[1,1])==TRUE){
  ClusterDataHDBM<-data.frame( File$Name, Inhib , Konz , HdbScanM$
    ↳ HdbCluster$cluster , HdbScanM$HdbCluster$area , HdbScanM$
    ↳ HdbCluster$N, HdbScanM$HdbCluster$N)
  colnames(ClusterDataHDBM)<-c(" File ", " Inhibitor ", "
    ↳ Concentration ", " ClusterNumber ", " Area ", " DotsPerCluster
    ↳ ", " ClusterDensity ")
} else{

```

```

ClusterDataHDBM<-data.frame( File$Name, Inhib , Konz ,HdbScanM$
  ↳ HdbCluster$cluster ,HdbScanM$HdbCluster$area ,HdbScanM$
  ↳ HdbCluster$N,HdbScanM$HdbCluster$N/HdbScanM$
  ↳ HdbCluster$area)
colnames(ClusterDataHDBM)<-c(" File ", " Inhibitor ", "
  ↳ Concentration ", " ClusterNumber ", " Area ", " DotsPerCluster
  ↳ ", " ClusterDensity ")
}
SingleClusterDataAllHDBM<-rbind( SingleClusterDataAllHDBM ,
  ↳ ClusterDataHDBM)

#collect nuber of signals per ROI
ClusterP<-data.frame( File$Name, Pattern$N, PatternM$N, Pattern$N-
  ↳ PatternM$N)
colnames(ClusterP)<-c(" File ", " Total_signals ", " Cluster_signals ", "
  ↳ Background_signals ")
Clusternumber<-rbind( Clusternumber , ClusterP)

Prog=paste( " Finished_file " ,j , " of " ,length( Filelist ) , sep="_")
print(Prog)
flush.console()
toc()
}

Tmp <- paste(Path , "/" , " singledataAllDB . csv " , sep = " ")
write.table( SingleClusterDataAllDB , file=Tmp, sep = " , " ,row.names=FALSE)

Tmp <- paste(Path , "/" , " singledataAllDBM . csv " , sep = " ")
write.table( SingleClusterDataAllDBM , file=Tmp, sep = " , " ,row.names=FALSE)

Tmp <- paste(Path , "/" , " singledataAllHDB . csv " , sep = " ")
write.table( SingleClusterDataAllHDB , file=Tmp, sep = " , " ,row.names=FALSE)

Tmp <- paste(Path , "/" , " singledataAllHDBM . csv " , sep = " ")
write.table( SingleClusterDataAllHDBM , file=Tmp, sep = " , " ,row.names=FALSE)

Tmp <- paste(Path , "/" , " Clusternumber . csv " , sep = " ")
write.table( Clusternumber , file=Tmp, sep = " , " ,row.names=FALSE)

toc()

```

5.2.1 Funktion: dbscan

```
step_dbscan <- function(x, eps, minpts) {
  Smodbs <- SMOLR_DBSCAN(x, eps = eps, MinPts = minpts)

  Cluster <- SMOLR_POINT_FEATURES(Smodbs)

  DbList <- list(DBScan = Smodbs)
  nClust <- max(Smodbs$dbscan$Cluster, na.rm = TRUE)

  #delete background
  for (i in 1:length(Smodbs$dbscan$Cluster)) {
    if (Smodbs[["dbscan"]][["Cluster"]][i] == 0) {
      Smodbs$dbscan$Cluster[i] <- NA
    }
  }

  if (nrow(Cluster) == 0) {
    CPlot <- ggplot(Smodbs$dbscan, aes(x = Smodbs$dbscan$X, y =
      ↪ Smodbs$dbscan$Y, color = Smodbs$dbscan$Cluster)) +
    geom_point(size = .4, shape = 16) + coord_fixed(ratio = 1)
    ↪ +
    labs(title = "", x = "", y = "") +
    theme_void() +
    theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5), legend.
      ↪ position = "none") +
    xlim(Pattern$window$xrange) +
    ylim(Pattern$window$yrange)

    tmp <- data.frame(matrix(nrow = 1, ncol = 14, NA))
    colnames(tmp) <- c("Channel", "cluster", "meanX", "meanY",
      ↪ "sd", "width", "area", "perimeter", "major_axis", "
      ↪ minor_axis", "ratio", "angle", "N", "skeleton")
    Cluster <- tmp
  } else{
    CPlot <- ggplot(Smodbs$dbscan, aes(x = Smodbs$dbscan$X, y =
      ↪ Smodbs$dbscan$Y, color = Smodbs$dbscan$Cluster)) +
    geom_point(size = .4, shape = 16) +
    coord_fixed(ratio = 1) +
    labs(title = "", x = "", y = "") +
```



```
theme_void() +  
theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5), legend.  
      ↪ position = "none") +  
scale_color_gradientn(colours = rainbow(nrow(Cluster))) +  
xlim(Pattern$window$ xrange) +  
ylim(Pattern$window$ yrange)  
}  
  
DbList <- append(DbList, list(DbCluster = Cluster, DbPlot = CPlot))  
return(DbList)  
}
```

5.2.2 Funktion: hdbscan

```
step_hdbscan <- function(x, minpts) {

Hdbs <- dbSCAN::hdbSCAN(x = x[, 1:2], minPts = minpts)

HdbsData <- data.frame(x[, 1], x[, 2], x[, 3], Hdbs$cluster)
names(HdbsData) <- c("X", "Y", "Precision", "Cluster")
HdbsData$Channel <- 1

parameters <- SMoLR::SMoLR_PARAMETER(HdbsData)
clust_parameters <- data.frame(matrix(ncol = 12, nrow = 0))

for (j in min(HdbsData$Cluster):max(HdbsData$Cluster)) {
Tmp2 = subset(HdbsData, Cluster == j)
clust_parameters_temp <- cbind(SMoLR::SMoLR_PARAMETER(Tmp2), binary_no = j)
if (j == 0) {
names(clust_parameters) <- names(clust_parameters_temp)
}
clust_parameters <- rbind(clust_parameters, clust_parameters_temp)
}

inputs <- list(MinPts = minpts)

Smohdbs <- c(dbSCAN = list(HdbsData), parameters = list(parameters), clust_
  ↪ parameters = list(clust_parameters), inputs = list(inputs))

class(Smohdbs) <- "smolr_dbSCAN"

HdbCluster <- SMoLR::SMoLR_POINT_FEATURES(Smohdbs)

HdbList <- list(HdbSCAN = Smohdbs)
nClust <- max(Smohdbs$dbSCAN$Cluster, na.rm = TRUE)
#delete background
for (i in 1:length(Smohdbs$dbSCAN$Cluster)) {
if (Smohdbs$dbSCAN$Cluster[[i]] == 0) {
Smohdbs$dbSCAN$Cluster[i] <- NA
}
}
}
```

```

if (nrow(HdbCluster) == 0) {

HdbPlot <- ggplot(Smohdbs$dbscan, aes(x = Smohdbs$dbscan$X, y = Smohdbs$
  ↳ dbscan$Y, color = Smohdbs$dbscan$Cluster)) +
geom_point(size = .4, shape = 16) +
coord_fixed(ratio = 1) +
labs(title = "", x = "", y = "") +
theme_void() +
theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5), legend.position = "none") +
xlim(Pattern$window$ xrange) +
ylim(Pattern$window$ yrange)

tmp <- data.frame(matrix(nrow = 1, ncol = 14, NA))
colnames(tmp) <- c("Channel", "cluster", "meanX", "meanY", "sd", "width", "
  ↳ area", "perimeter", "major_axis", "minor_axis", "ratio", "angle", "N"
  ↳ , "skeleton")
HdbCluster <- tmp

} else {

HdbPlot <- ggplot(Smohdbs$dbscan, aes(x = Smohdbs$dbscan$X, y = Smohdbs$
  ↳ dbscan$Y, color = Smohdbs$dbscan$Cluster)) +
geom_point(size = .4, shape = 16) +
coord_fixed(ratio = 1) +
labs(title = "", x = "", y = "") +
theme_void() +
theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5), legend.position = "none") +
xlim(Pattern$window$ xrange) +
ylim(Pattern$window$ yrange) +
scale_color_gradientn(colours = rainbow(length(Smohdbs$dbscan$Cluster)))

}
HdbList <- append(HdbList, list(HdbCluster = HdbCluster, HdbPlot = HdbPlot)
  ↳ )
return(HdbList)
}

```

5.2.3 Funktion: threshold

```
step_threshold <- function(x, bs, bw, thr) {  
  KdeHm <- MASS::kde2d(x$x..nm., x$y..nm., n = bs, h = bw)  
  KdeHm2 <- KdeHm  
  Bw <- matrix(data = NA,  
    nrow = bs,  
    ncol = bs)  
  
  KdeHm2$z[KdeHm2$z <= thr] <- 0  
  KdeHm2$z[KdeHm2$z > 0] <- 1  
  
  Bw[KdeHm$z <= thr] <- FALSE  
  Bw[KdeHm2$z > 0] <- TRUE  
  
  KdeHmTiles <- data.frame(matrix(nrow = 0, ncol = 3))  
  
  for (i in 1:bs) {  
    XTmp <- matrix(nrow = bs, ncol = 1, KdeHm$x[i])  
    YTmp <- KdeHm$y  
    ZTmp <- KdeHm2$z[i, ]  
    KdeHmTilesTmp <- data.frame(XTmp, YTmp, ZTmp)  
    KdeHmTiles <- rbind(KdeHmTiles, KdeHmTilesTmp)  
  }  
  colnames(KdeHmTiles) <- c("x", "y", "dens")  
  
  Mask <-  
  owin(  
    xrange = c(min(x[, 3]), max(x[, 3])),  
    yrange = c(min(x[, 4]), max(x[, 4])),  
    mask = t(Bw)  
  )  
  
  #heatmap  
  HmPlot <-  
  ggplot(x, aes(x = x$x..nm., y = x$y..nm.)) + coord_fixed(ratio = 1) + stat_  
    ↪ density2d(  
    aes(fill = stat(density)),  
    contour = FALSE,
```

```

geom = 'tile',
show.legend = FALSE,
n = bs,
h = bw
) + scale_fill_viridis() + labs(
  title = "",
  x = "",
  y = ""
) + theme_void() + theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5))

#binary mask
BmPlot <-
ggplot(KdeHmTiles) + geom_point(aes(x, y, color = KdeHmTiles$dens), show.
  ↳ legend = FALSE) + scale_color_gradient(low = "black", high = "white")
  ↳ + coord_fixed(ratio = 1) + labs(
  title = "",
  x = "",
  y = ""
) + theme_void() +
geom_segment(aes(x=max(x[,3])-1200,y=min(x[,4])+200,xend=max(x[,3])-200,
  ↳ yend=min(x[,4])+200,size=3,col="white"))+
theme(legend.position = "none")

Threshold <- list(Mask = Mask, HmPlot = HmPlot, BmPlot = BmPlot)
return(Threshold)
}

```

Erklärung der eigenen Arbeit

Ich habe alle Experimente, Datenanalysen und das Verfassen der vorgestellten Arbeit durchgeführt mit Ausnahme der folgenden:

- Die R-Skripte in 5.2, 5.2.1, 5.2.2 und 5.2.3 wurden von Steffen Paech bereitgestellt

Danksagung

Diese Seite möchte ich gerne den Personen widmen, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich möchte mich zuerst bei **Herrn PD Dr. Tobias Meckel** bedanken, mit dem ich seit der Rettung meiner Bachelor-Thesis bis hin zur Dissertation, eine wunderbare Reise durch die verschiedensten Aspekte der Naturwissenschaften erleben durfte. Es hat niemals an spannenden Themen, Tatendrang, neuen Forschungsansätzen und Ideen sowie an Motivation und Kaffee gemangelt. Es war eine wirklich schöne Zeit, die mich beruflich sowie menschlich sehr weit gebracht hat. Vielen Dank!

Natürlich gilt mein Dank auch **Herrn Dr. Markus Langhans**, der durch sein unschätzbares Wissen und seine vielen Ideen unverzichtbar für ein wissenschaftliches Arbeiten ist. Mit seinem Auge fürs Detail und seinem ständigen Drang, neues auszuprobieren, ist eine berufliche und zwischenmenschliche Weiterentwicklung an seiner Seite garantiert.

Gerne bedanke ich mich auch bei **Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel** für die Übernahme des Koreferats und der ständigen Hilfsbereitschaft.

Genauso möchte ich gerne **Robert Lehn** und **Steffen Paech** danken, die mich vor allem während meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben. Ohne den ständigen Austausch an Ideen und Bedenken, wäre diese Arbeit niemals in dieser Form möglich gewesen. Natürlich danke ich auch **Dr. Laura Babel** für ihre Vorarbeit in der Clusteranalyse, auf der die Idee meiner Arbeit beruht.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei der gesamten **AG Thiel**, die durch ihre vielen gemeinsamen Unternehmungen für mich immer mehr war, als eine reine Arbeitsgruppe.

Auf jeden Fall bedanke ich mich auch bei **Herrn Dr. Matthias Frech** für seine finanzielle Unterstützung und sein Interesse an diesem gemeinsam erdachten Thema.

Natürlich gilt mein Dank ebenfalls meiner Familie, die mich mit allen ihr möglichen Mitteln und zu jeder Zeit unterstützt hat. Vor allem aber danke ich meiner Frau Alexandra, die mich durch ihre wundervolle Art stets unterstützt und zu einem besseren Menschen gemacht hat. Ohne dich wäre ich niemals soweit gekommen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung	mL Milliliter
ATP Adenosintriphosphat	mg Milligramm
BSA <i>bovine serum albumin</i>	min Minuten
dd doppelt-destilliert	nm Nanometer
DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	nM Nanomolar
ECM Extrazelluläre Matrix	NOAEL <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	PALM <i>photoactivated localization microscopy</i>
FA Fokale Adhäsion	PBS <i>phosphate-buffered saline</i>
FAK Fokale Adhäsionskinase	pfa Paraformaldehyd
FAT <i>focal adhesion targeting</i>	PRR Prolin-reiche Regionen
FCS <i>fetal calf serum</i>	ptk2 Phosphotyrosinkinase 2
g Gramm	RT Raumtemperatur
GPCR G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	rpm <i>rounds per minute</i>
h <i>hour</i>	Src Name des Proteins, Ursprung als Akronym aus <i>sarcoma</i>
IC₅₀ <i>half maximal inhibitory concentration</i>	SUMO <i>small ubiquitin-related modifier</i>
LD₅₀ <i>Median Lethal Dose</i>	TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphin
L Liter	TIRF <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
LOAEL <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>	UV Ultraviolettes Licht
M Molar	
MEF Embryonale Mausfibroblasten (<i>mouse embryo fibroblast</i>)	

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung einer fokalen Adhäsion	4
2	Schematischer Aufbau eines FAK-Moleküls	6
3	Konfokalmikroskopische Aufnahme von MEF-Zellen	8
4	Der FAK-spezifische Inhibitor Y11	13
5	Der FAK-spezifische Inhibitor Y15	13
6	Schematische Darstellung der Kapiteleinteilung des Ergebnisteils	14
7	MEF-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y15	18
8	SW620-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y15	19
9	Lebendzellfärbung mittels Calcein Red TM nach einer oder 24 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor Y15	21
10	MEF-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y11	22
11	SW620-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Y11	23
12	Lebendzellfärbung mittels Calcein Red TM nach einer oder 24 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor Y11	24
13	Unterschiedliche Antikörpermarkierungen bei MEF-Zellen	27
14	Antikörpermarkierungen von FAK und pFAK	29
15	Der Quotient aus den durch die verschiedenen Methoden ermittelten Cluster durch die zugrunde liegenden Parameter (<i>ground truth</i>)	32
16	Überblick der simulierten Daten und deren Auswertung bezüglich der Clusterun- terscheidungen	33
17	Überblick der simulierten Daten und deren Auswertung bezüglich der Dichtemaske	35
18	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 1 μ M (A, C, E) und 5 μ M (B, D, F) des Inhibitors Y15	37
19	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 10 μ M des Inhibitors Y15	38
20	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 50 nM (A, C, E) und 250 nM (B, D, F) des Inhibitors Y11	40
21	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in MEF-Zellen nach der Inkubation mit 500 nM des Inhibitors Y11	42
22	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 1 μ M (A, C, E) und 250 nM (B, D, F) des Inhibitors Y15	44
23	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 10 μ M des Inhibitors Y15	45
24	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 50 nM (A, C, E) und 250 nM (D-F) des Inhibitors Y11	47

25	Clusteranalyse von pFAK-Cluster in SW620-Zellen nach der Inkubation mit 500 nM des Inhibitors Y11	48
26	Schematische Darstellung der beobachteten Ergebnisse	49
27	Schematische Darstellung der Clusteränderung bei MEF- (A) und SW620-Zellen (B)	50
28	Fokale Adhäsion mit Antikörpermarkierter-pFAK und gefärbten Aktinsträngen . .	53
29	Langzeitmessung lebender Zellen (MEF: A-D ; SW620: E-H) mit Inkubation von 50 μ M Y15 (C-D ; G-H)	55
30	Gegenüberstellung von simulierten und realen Messdaten in Form eines Punktediagramms	56
31	Darstellung eines MTT-Tests an SW620-Zellen unter Einfluss von Y15 und Y11 nach 24 Stunden	59
32	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Darstellung der <i>on-states</i> und <i>off-states</i> von Fluorophoren	68
33	Ein einzelnes Bild des 2000 Bilder großen Stapels der Rohdaten, der optische Mittelwert des Stapels und die ThunderSTORM Projektion des Stapels	69

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den _____

A.Krömmelbein